

UNIVERSITE BORDEAUX SEGALEN

## THÈSE

Thèse pour le Doctorat de l'Université Bordeaux 2  
Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
Mention : Sciences, Technologies, Santé  
Option : Biochimie

Par  
**AHISSAN AIME**

**OLIGONUCLEOTIDES AMPHIPHILES ET  
MICROARNS : MISE EN PLACE DE  
NANOPLATEFORMES A VISEE DIAGNOSTIQUES  
ET THERAPEUTIQUES**

Soutenue le 13 février 2013 devant le jury composé de:

**Jacques LEBRETON**, Pr, UFR des Sciences de Nantes, **Président du jury**

**Patrick MIDOUX**, DR CNRS, Orléans, **Rapporteur**

**Line BOUREL**, Pr, UFR de Pharmacie de Strasbourg, **Rapporteur**

**Christophe GROSSET**, CR1 Inserm, Bordeaux, **Examineur**

**Isabelle BESTEL**, Pr, UFR de Pharmacie de Bordeaux, **Directeur de thèse**



# Remerciements

---

*J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie le Professeur Jacques Lebreton qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie également le Professeur Line Bourel et le Directeur de Recherche Patrick Midoux d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie le Chargé de Recherche Christophe Grosset pour l'examen de ce mémoire.*

*Ce travail de thèse a été effectué à l'université de Bordeaux II dans l'unité INSERM U869 sous la direction du professeur Isabelle Bestel. Je tiens à lui formuler mes sincères remerciements pour m'avoir confié ce projet de recherche, pour son enthousiasme, ses conseils et pour son soutien durant ces trois années de thèse. Un grand merci aussi aux professeurs Philippe Barthélémy et Jean-Louis Mergny pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de leur unité de recherche.*

*Je souhaite également adresser ma profonde gratitude au Dr. Carmelo Di Primo pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la Recherche et pour m'avoir donné envie de faire une thèse. Merci pour votre rigueur, pour votre envie de transmettre et surtout pour votre bienveillance à mon égard.*

*Je voudrais également adresser de profonds remerciements au Chargé de Recherche Cathy Staedel pour son aide précieuse en ce qui concerne la culture cellulaire et pour tout ce qu'elle m'a appris au cours de mes travaux de recherches.*

*Un grand merci également à Christophe Grosset pour sa collaboration et surtout pour son initiation aux analyses FunREG, ainsi que ses encouragements.*

*Je remercie tous ceux sur qui repose le bon fonctionnement du laboratoire : Jacques Puyol et Sandrine Chabas pour toute la logistique, et finalement Kati Ba-Pierozzi pour sa disponibilité et sa réactivité.*

*Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont participé à ce projet : Amit Patwa, Oleksandr Pokholenko et Arnaud Gissot pour les synthèses organiques et Marion Maurel. De manière très particulière je voudrais adresser mes sincères remerciements à Nataliia Beztsinna qui a activement participé à l'avancement de ces travaux de thèse. Je pense également à toutes les personnes impliquées dans les synthèses d'oligonucléotides : Nathalie Pierre, Frédéric Vigié et Brune Vialet. Merci également au Dr Laurent Azema pour ses conseils de chimiste, sa disponibilité et pour l'HPLC.*

*Je remercie tous les autres membres de l'équipe ChemBioMed et de l'unité INSERM U869 pour leur soutien, leurs encouragements et leurs critiques constructives lors des réunions qui m'ont permis d'avancer.*

*Merci à mes autres collègues de bureau : le Dr. Khalid Oumzil, Thininhane Chaou pour leurs encouragements, et surtout Hélène Arnion pour son inébranlable bonne humeur.*

*Je tiens à remercier mes plus proches amis qui de près ou de loin, m'ont toujours soutenue, ainsi que mes « colocataires » qui m'ont supporté tout au long de cette période, ce qui n'a pas toujours été facile.*

*Je n'oublie pas mon fiancé qui a toujours été là dans les bons moments, comme dans les passages à vide.*

*Je voudrais finalement adresser mes plus sincères remerciements et ma profonde gratitude à ma famille : mes parents Eliane et Aimé, mes frères Pierre, Arthur et Louis-Armand. Merci pour le soutien indéfectible que vous m'avez apporté tout au long de ces trois années et depuis toujours.*

*Merci à DIEU*

*et Merci à Tous.....*

*Je dédie ce travail à mes parents.*

# Sommaire

---

<b>Abréviations.....</b>	<b>8</b>
<b>PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>11</b>
A. PRESENTATION GENERALE.....	12
B. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	14
I. Les microARN.....	14
1. Introduction sur les microARN.....	14
2. Maturation des miARN.....	14
3. Fonctions des miARN.....	19
4. Dérégulation des miARN dans les cancers.....	21
5. Applications biomédicales des miARN.....	25
6. Focus sur miR-21.....	31
II. Les oligonucléotides amphiphiles (ONA).....	35
1. Stratégies de vectorisation des oligonucléotides.....	36
2. Intérêt des ONA.....	37
3. Stratégies de synthèse.....	37
4. Impacts de la bioconjugaison.....	49
5. Applications.....	50
<b>PARTIE II : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES OLIGONUCLEOTIDES AMPHIPHILES.....</b>	<b>54</b>
I. Conception des ONA.....	55
II. Les oligonucléotides.....	56
1. Choix des séquences nucléotidiques.....	56
2. Synthèse des oligonucléotides.....	56
3. Clivage du support et déprotection des oligonucléotides.....	64
4. Purification des oligonucléotides.....	65
III. Bioconjugaison.....	67
1. Molécules hydrophobes utilisées pour la bioconjugaison.....	67
2. Stratégies adoptées pour la bioconjugaison.....	69
3. Purification des ONA.....	80
<b>PARTIE III : PLATEFORME-QD A VISEE DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE.....</b>	<b>84</b>
I. Présentation générale de la nanoplateforme QD-ONA.....	85
II. Les QDs.....	86

1.	Structure chimique des QDs.....	86
2.	Propriétés électroniques et optiques des QDs.....	87
3.	Fonctionnalisation des QDs par des biomolécules.....	89
4.	Applications biomédicales des QDs.....	92
III.	miARN cible.....	94
IV.	Mise en place de la nanoplateforme.....	94
1.	Etape de solubilisation (formation de micelles).....	95
2.	Etape de fonctionnalisation.....	102
V.	Etude de l'hybridation <i>in vitro</i> .....	106
1.	Résonance plasmonique de surface.....	106
2.	Expériences de SPR.....	109
3.	Résultats et discussion.....	111
VI.	Etude de l'hybridation <i>in cellulo</i> .....	117
1.	Etude de pénétration cellulaire.....	117
2.	Etude d'hybridation <i>in cellulo</i> .....	119
3.	Résultats et discussion.....	121
VII.	Conclusion et perspectives.....	122

#### **PARTIE IV : PLATEFORME HSA A VISEE THERAPEUTIQUE.....126**

I.	Présentation générale de la plateforme.....	127
II.	Sérum Albumine Humaine.....	127
1.	Généralités sur la SAH.....	127
2.	Caractéristiques structurales.....	128
3.	Applications biomédicales de la SAH.....	129
III.	miARN cible.....	132
IV.	Optimisation des oligonucléotides.....	134
1.	Design des analogues de miR-96.....	134
2.	Synthèse.....	137
3.	Expériences de dénaturation thermique.....	139
4.	Evaluation biologique.....	141
V.	Optimisation des oligonucléotides amphiphiles.....	146
1.	Design des ONA.....	146
2.	Synthèse des ONA.....	147
3.	Caractérisations physico-chimiques des ONA.....	150
4.	Etude de la pénétration cellulaire des ONA.....	153
5.	Evaluation biologique.....	158

VI.	Mise en place de la nanoplateforme.....	162
1.	Etude de l'interaction SAH-ONA par SPR.....	162
2.	Résultats et discussion.....	163
VII.	Conclusions et perspectives.....	167
<b>PARTIE V : MATERIELS ET METHODES.....</b>		<b>172</b>
A.	OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS.....	173
I.	Oligonucleotide synthesis.....	173
II.	Amphiphile oligonucleotides synthesis.....	174
III.	Oligonucleotide deprotection.....	193
IV.	Oligonucleotide Purification.....	195
B.	QD-PLATFORM.....	197
I.	QD water solubilization (formation of micelles).....	197
II.	Physico-chemical characterizations.....	200
III.	<i>in vitro</i> hybridization, Surface Plasmon Resonance (SPR).....	201
IV.	Cell studies.....	202
C.	HSA-PLATFORM.....	206
I.	miRNA mimics.....	206
II.	Physico-chemical characterizations.....	206
III.	Cell studies.....	208
IV.	HSA-LON interaction, Surface Plasmon Resonance (SPR).....	211
	Références bibliographiques.....	214
	Résumés.....	223
	Publications et communications.....	225

# Abréviations

---

AC : Anhydrase carbonique  
ACN : Acétonitrile  
ADH : Acide adipique  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
CAC : Concentration d'agrégation critique  
CED : Cyanoéthyl diisopropylamine  
CHC : Carcinome hépatocellulaire  
CM : Carboxy méthyl-dextran  
CMC : Concentration micellaire critique  
CPG: Controlled pore glass  
CuAAC : Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition  
DCA : Dichloroacétate  
DCM : Dichlorométhane  
DLS : Dynamic light scattering  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMF : N,N-diméthylformamide  
DMPG : Phospholipid dimyristoyl phosphatidylglycerol  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DMT : diméthoxytrityl  
DOPC : (1,2-DiOleoyl-sn-glycéro-3-PhosphoCholine)  
DOTAU (N-[5'-(2',3'-DiOleoyl)Uridine]-N',N',N'-TriméthylAmmonium Tosylate)  
DOTAU : N-[5'-(2',3'-DiOleoyl)Uridine]-N',N',N'-TriméthylAmmonium Tosylate  
EDTA : Ethylène Diamine Tetra Acétique  
EtOH : Ethanol  
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter  
FITC : Fluorescéine isothiocyanate  
FRET : Förster resonance energy transfer  
funREG : Functional, integrated and quantitative analysis of post-transcriptional regulation  
GFP : Green fluorescent protein  
HDA: Hexadecylamine  
HPLC : High performance liquid chromatography  
LNA : Locked nucleic acid  
LON : Lipid oligonucleotide  
MeOH : Méthanol  
MET : Microscopie Electronique à Transmission  
MET : Microscopie électronique à transmission  
miARN, miR : MicroARN  
MPA : Acide 3-mercaptopropionique  
NHS : N-hydroxysuccinimide.  
NPs : Nanoparticules  
nt : Nucléotide



OMA : Oligonucléotide anti-miRNA  
ON : Oligonucléotide  
ONA : Oligonucléotide amphiphile  
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis  
pb : Paires de bases  
PBS : Phosphate buffered saline  
PCR : Polymerase chain reaction  
PEG : PolyEthylèneGlycol  
PUOH: Palmitic Uridine  
PUPC : Palmitic Uridine PhosphoCholine  
QD : Quantum dots  
Rdt : Rendement  
Rf : Facteur de Rétention  
RISC: RNA inducing silencing complex  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
RT : Rétro-transcription  
RT-qPCR : Reverse transcription-quantitative PCR  
RU : Unité de résonance  
SA : Streptavidine  
SAH : Sérum albumine humaine  
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
siRNA : Small interfering RNA  
SPAAC : Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition  
SPARC : Secreted protein, acidic and rich in cysteine  
SPR : Surface plasmon resonance  
SVF : Sérum de Veau Foetal  
TA : Température Ambiante  
TBDMS : Terbutyldiméthylsilyle  
TBTA: Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine  
TEA : Triéthylamine  
TEM : Transmission Electron Microscopy  
TFA : Acide trifluoroacétique  
TGA : Acide thioglycolique  
THF : Tétrahydrofurane  
Tm : Température de fusion  
TMS : Tétraméthylsilane  
TOP : Trioctylphosphine  
TOPO : Trioctylphosphine oxyde  
UTR : Untranslated region  
VHC : Virus de l'hépatite C



PARTIE I :

INTRODUCTION GENERALE

---

## A. PRESENTATION GENERALE

Les **microARN** (miARN) sont de petits ARN non codants, de 18 à 25 nucléotides, jouant un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Ils contrôlent les taux de protéines en inhibant la traduction et/ou en induisant la dégradation des ARNm correspondants. Actuellement, l'intérêt de l'ARN interférence (siARN ou miARN) en cancérologie n'est plus à démontrer. Par rapport aux siARN dont certains sont en cours d'évaluation clinique, les miARN dont les effets sur un gène donné semblent plus modérés, pourraient avoir des qualités thérapeutiques insoupçonnées du fait de leur redondance fonctionnelle. En effet, un miARN peut réguler négativement l'expression de plusieurs dizaines de gènes, avec un impact évident en thérapie: une possibilité réduite des cellules cancéreuses à rétablir l'expression de tous ces gènes et survivre à une thérapie médiée par un miARN. Cette stratégie miARN est actuellement en plein essor. Par ailleurs, les miARN ont montré une grande spécificité vis-à-vis d'un tissu donné et du stade évolutif d'une maladie pouvant ainsi être considérés comme des outils diagnostics et pronostics plus discriminants que les transcriptomes classiques fondés sur les profils d'expression d'ARNm dans les tumeurs.

Les miARN possèdent un fort potentiel thérapeutique, mais comme tous les oligonucléotides, leur utilisation est limitée du fait de leur faible perméabilité cellulaire. Une manière originale de palier ce problème est la **bioconjugaison** avec des molécules lipidiques, qui conduit à l'obtention d'**oligonucléotides amphiphiles** (ONA). Les bioconjugués non seulement facilitent la délivrance cellulaire des oligonucléotides mais aussi permettent la construction de nanoplateformes médiée par l'ancre hydrophobe que représente leur partie lipidique.

La recherche de molécules ciblant les miARN pour la thérapie et de systèmes de détection des miARN pour l'imagerie et le diagnostic ont été abordées au cours de cette thèse. Ces deux approches reposent sur l'utilisation d'ONA chargés sur une **plateforme de quantum dots** (QDs) dans le premier cas et de **sérum albumine humaine** (SAH) dans le second cas. La cohésion de ces plateformes repose sur un effet hydrophobe entre le reste lipidique des ONA d'une part et la paroi hydrophobe de QDs et les sites de liaison des acides gras de la SAH d'autre part.

Les différentes étapes de la conception et de la réalisation de ces nanoplateformes ont été reportées dans cette thèse.

Dans la partie introductive, les miARNs et leur implication dans des maladies comme le cancer ont été présentés, ainsi que les stratégies thérapeutiques basées sur les miARN. Cette première partie a également été consacrée aux ONA, leurs propriétés et potentielles applications biotechnologiques et biomédicales.

Dans la deuxième partie, les différentes stratégies de synthèse mises en œuvre pour la préparation de nos ONA ont été décrites. La synthèse des oligonucléotides et celles des précurseurs lipidiques utilisés pour la modification hydrophobe des oligonucléotides ont été détaillées ainsi que l'étape ultime de bioconjugaison qui conduit au couplage covalent de ces deux entités.

La partie III a été consacrée au développement et à l'évaluation de la plateforme d'imagerie des miARNs. Dans ce chapitre, les différentes étapes et optimisations réalisées pour la mise en place de cette nanoplateforme ont été détaillées. La nanoplateforme possède en son cœur des nanocristaux de QDs et en surface des oligonucléotides anti-miARN amphiphiles pour la détection et l'imagerie du miARN d'intérêt. Le miARN modèle utilisé ici, est miR-21, largement surexprimé dans de nombreux types de cancer. Une fois cette plateforme caractérisée d'un point de vue physico-chimique (taille, forme, potentiel zeta, propriétés de fluorescence), sa capacité à reconnaître le miARN d'intérêt (miR-21) *in vitro* par résonance plasmonique de surface et *in cellulo* par RTqPCR a été démontrée.

La dernière partie a été consacrée à la mise en place de la plateforme de délivrance des miARN dans le cadre du traitement du carcinome hépatocellulaire (CHC), cancer primitif et très agressif du foie. Il a été démontré que miR-96 était capable d'inhiber la prolifération des cellules du CHC en régulant une protéine, le glypican3, inducteur de la prolifération des cellules cancéreuses. Le design et la synthèse d'analogues de miR-96 amphiphiles ont été réalisés conduisant à l'obtention d'une petite chimiothèque de molécules. La partie oligonucléotidique ainsi que la partie hydrophobe de ces bioconjugués ont été optimisées au cours de ce travail. L'affinité des candidats sélectionnés sur la plateforme de SAH a ensuite été évaluée par résonance plasmonique de surface. Tous ces résultats ont été détaillés.

## **B. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

### **I. Les microARN**

#### **1. Introduction sur les microARN**

Les microARN (miARN, miR) sont de petits ARN non codants, longs d'une vingtaine de nucléotides (de 18 à 25 nt), dont la fonction est de réguler l'expression des gènes, de manière post-transcriptionnelle. Ils ciblent un ou plusieurs ARN messager (ARNm), ce qui conduit au clivage de ces derniers ou à l'inhibition de la traduction génique.

Le premier miARN a été découvert par Lee, Feinbaum et Ambros en 1993 chez *C. elegans*. Il s'agissait de lin-4 qui ne codait pour aucune protéine mais pour une paire d'ARN courts capable de contrôler le développement larvaire en inhibant la traduction de lin-14, gène codant pour une protéine nucléaire [1,2]. Quelques années plus tard, le second miARN, let-7, a été découvert. Il s'est révélé être similaire à lin-4, par son implication dans le développement larvaire de *C. elegans* [3]. Lee et al. ont alors émis l'idée que la régulation induite par ces petits ARN était en partie due à leur complémentarité de séquence avec la région 3' non traduite (Untranslated Region : UTR) de l'ARNm cible de Lin-14.

Depuis la découverte de let-7, des milliers de miARN ont été identifiés et nous pouvons aujourd'hui comprendre le rôle fondamental joué par ces petites molécules régulatrices. A ce jour, 18 226 miARN ont été identifiés dans des organismes aussi divers que variés : plantes, virus, animaux dont 1527 miARN dans le génome humain. L'identification des gènes de miARN a été possible par le développement de diverses techniques de biologie moléculaire, mais aussi par la mise au point d'outils bio-informatiques, très utiles pour les prédictions [4-8]. Les miARN sont actuellement répertoriés dans une base appelée miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

#### **2. Maturation des miARN**

Contrairement aux siARN qui sont des molécules exogènes utilisées pour leur effet d'extinction génique, les miARN sont des molécules endogènes. Leurs gènes sont transcrits dans le noyau en pri-miARN qui subiront des étapes de maturation conduisant aux miARN matures capables d'interagir avec les ARNm des gènes qu'ils régulent. Les siARN et les miARN utilisent tous deux la machinerie de l'ARN interférence pour produire l'effet de «silencing» (Figure I.1).

##### **2.1. Les gènes**

Les recherches bio-informatiques et les cribles génétiques, mis en œuvre afin d'identifier les miARN, ont permis de comprendre l'organisation génomique des gènes codant les miARN [9,10].

En fonction de leur localisation dans le génome, ces gènes peuvent être classés comme suit:

“-intrinsic miRNAs in coding transcription units (TUs)

-intrinsic miRNAs in noncoding TU,

-exonic miRNAs in coding TU

-exonic miRNAs in noncoding TU”

La majorité des miARN sont situés dans des régions intergénomiques, tandis que quelques-uns ont été retrouvés dans des régions introniques. La moitié de tous les miARN connus sont placés à proximité d'autres miARN. Ils sont regroupés en « clusters » et sont exprimés comme des transcrits polycistroniques.

L'ARN polymérase II (Pol II) est principalement responsable de la transcription des gènes de miARN [11,12], mais un petit groupe de transcrits résulte de l'action de l'ARN polymérase III (Pol III) [13]. Pol II permet un contrôle temporel de l'expression des miARN, de sorte qu'un ensemble de miARN peut être synthétisé dans des conditions physiologiques particulières à différents stades du développement et en fonction du type cellulaire.

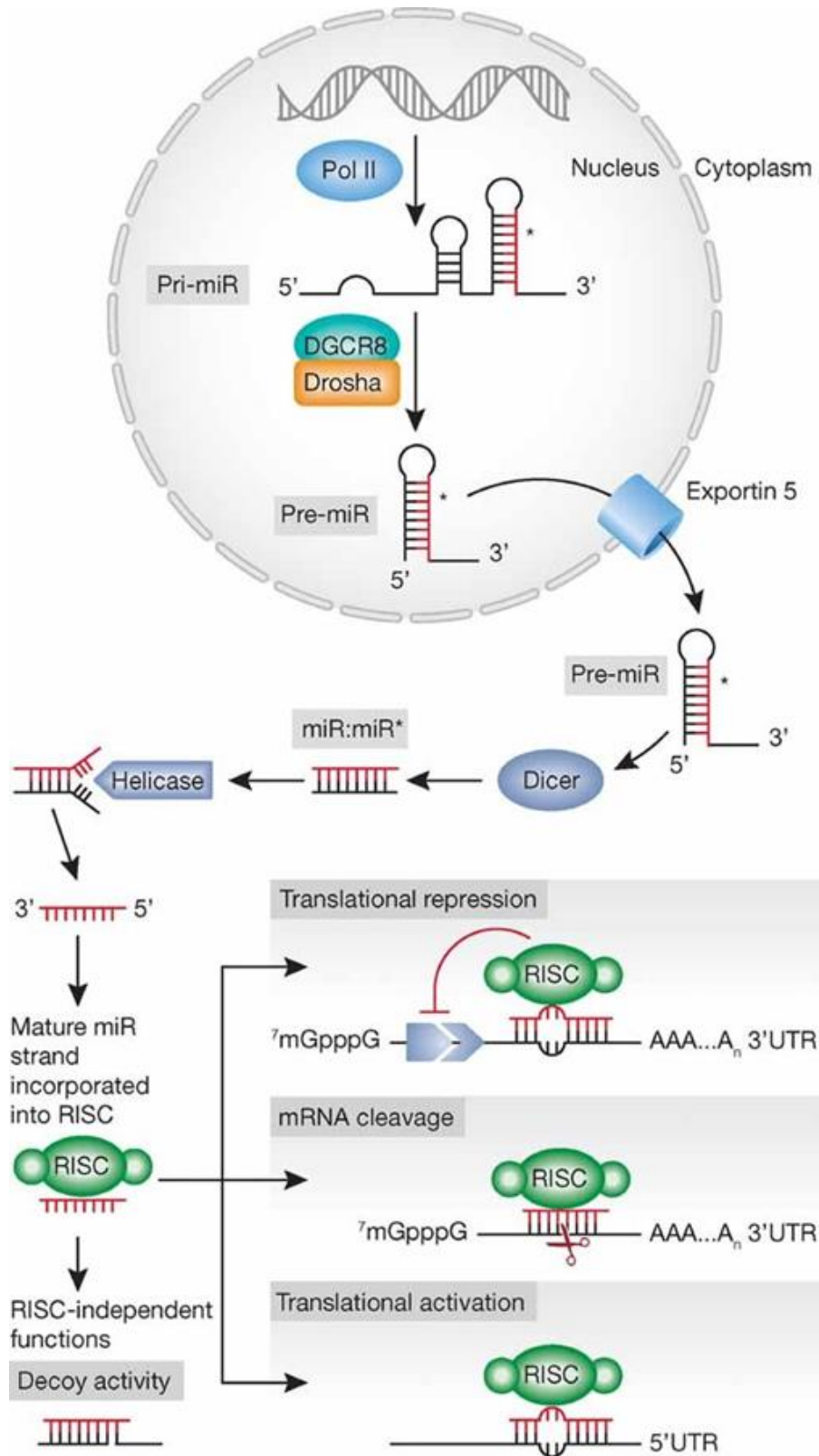


Figure I.1 : La maturation des microARN.



## **2.2. Etapes de maturation dans le noyau**

Tous les gènes de miARN sont transcrits dans le noyau. Les pri-miARN, produits par la Pol II, sont habituellement des oligonucléotides de plusieurs kilobases de long et contiennent des structures en tige-boucle ou épingle à cheveux. Ces pri-miARN, après clivage enzymatique, libèrent des tige-boucles d'environ 60-70 nt de long connues sous le nom de précurseur de miARN (pre-miARN) [14,15]. Cette étape est effectuée par la protéine Drosha et nécessite chez l'homme, l'intervention de la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8 [16,17]).

Drosha et DGCR8 forment un grand complexe connu sous le nom de complexe nucléaire microprocesseur [18]. En règle générale, DGCR8 interagit avec le segment d'ARN simple brin et guide la protéine Drosha qui clive la séquence pri-miARN.

Ce clivage se fait à environ 11 paires de bases (pb) de la structure en tige-boucle et conduit à la formation du pre-miARN avec un groupement phosphate à l'extrémité 5' et une extrémité 3' « décalée », c'est-à-dire protubérante, généralement constituée de 2 nucléotides [19,20].

## **2.3. Export dans le cytoplasme**

Les pre-miARN sont transportés dans le cytoplasme où leur maturation sera achevée avant de pouvoir participer à la régulation des gènes. Le transport des pre-miARN est réalisé par des pores nucléaires, qui sont de grands complexes protéiques incorporés dans la membrane nucléaire et est médié par un mécanisme lié au cofacteur Ran-GTP. Il s'agit de l'exportine 5, EXP5 [21,22].

Dans le modèle de transport proposé, l'export du pre-miARN est initié lorsque EXP5 reconnaît une structure d'ARN en double brin supérieure à 14 pb avec une extrémité 3' protubérante. Cette reconnaissance est suivie par la liaison coopérative du pre-miARN et du cofacteur Ran-GTP dans le noyau. Le pre-miARN lié à EXP5 est alors exporté hors du noyau et l'hydrolyse du GTP va permettre la libération du pre-miARN dans le cytoplasme [23,24].

## **2.4. Etapes de maturation dans le cytoplasme**

Le pre-miARN libéré dans le cytoplasme va être de nouveau clivé pour donner le miARN mature. Le clivage est effectué cette fois, par une endonucléase cytoplasmique : Dicer (RNase III), assistée des protéines TRBP (*TAR RNA Binding Protein*) et PACT (*Protein Activator of PKR*) [25-28]. Dicer est une enzyme hautement spécifique et conservée qui existe dans presque tous les organismes eucaryotes.

Selon le modèle courant, après le clivage généré par Dicer, le miARN sous forme d'un duplexe d'environ 22 nt, est incorporé dans une protéine de la famille Argonaute (Ago) [29,30]. La plupart du temps un des deux brins du duplexe de miARN, le brin passager (miARN\*) est dégradé par un mécanisme peu connu, alors que l'autre brin, appelé brin guide (miARN) reste lié à la protéine. Il a été démontré que l'activité endo-nucléolytique de la protéine Ago était responsable de l'élimination du brin passager [31]. Certaines protéines Ago manquent d'activité lytique ce qui empêche le clivage du brin passager. D'autres études suggèrent qu'une ARN hélicase (pas encore identifiée) permettrait le déroulement et la déshybridation du brin passager.

Des données récentes ont prouvé que la stabilité thermodynamique des deux extrémités du double brin du miARN pouvait déterminer lequel de ces deux brins était sélectionné pour devenir le brin guide [32]. Il s'agit généralement du brin présentant la paire de bases la plus instable à l'extrémité 5'.

Le miARN simple brin (guide) est ensuite intégré dans le complexe ribonucléoprotéique nommé RISC (*RNA-induced silencing complex*) ou encore miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), afin de le distinguer du mécanisme d'ARN interférence faisant intervenir les siARN [33-35]. Le complexe miRISC contient le miARN mature, les protéines Dicer et TRBP et les protéines Ago. Les membres de cette famille de protéines sont les composants les mieux caractérisés de ce complexe. Le miARN chargé sur le miRISC va être guidé par ce dernier sur un ou plusieurs ARNm cible(s) portant une ou plusieurs séquences complémentaires à celle du miARN.

## **2.5. Mode d'action sur la cible**

Le complexe miRISC se fixe sur l'ARNm cible au niveau de régions spécifiques plus ou moins complémentaires de la séquence des miARN, appelées MREs pour *miRNA Recognition Elements* [36,37].

Les appariements ont généralement lieu dans la région 3' non traduite des ARNm, mais des régulations dans la région 5' non traduite ont également été identifiées ainsi qu'au niveau des cadres ouverts de lecture d'ARNm [38].

Ces appariements suivent des règles précises régies par 3 principes majeurs qui ont été déterminés de manière expérimentale et bio-informatique [39,40]:

- Le premier principe est que l'appariement entre le miRNA et l'ARNm doit être parfait et continu dans la séquence « graine », comprise entre les nucléotides 2 et 8 du miARN. Cet appariement constitue l'événement primaire dans l'interaction miARN-ARNm. La présence de mésappariements,

dans cette région déstabilise considérablement l'interaction miARN-ARNm et affecte par conséquent la répression traductionnelle régulée par le miARN. Il est important de préciser que différents miARN peuvent posséder une même séquence « graine ». Ils sont alors regroupés en famille.

- Le deuxième principe est que les mésappariements, s'ils existent doivent être présents dans la région centrale du duplexe miARN-ARNm empêchant ainsi la dégradation de l'ARNm cible.

- Enfin, une complémentarité « raisonnable » doit être observée entre l'extrémité 3' du miARN et l'ARNm, ceci afin de stabiliser l'interaction miARN-ARNm.

D'autres facteurs augmentent l'efficacité de cette interaction, comme, par exemple, la présence, près des régions MREs, d'une séquence « AU-rich », du codon stop ou de la queue poly(A) [41].

Les modalités d'action du complexe miRISC sont relativement mal comprises, mais semblent contrôlées par la qualité du duplexe miARN-ARNm mis en jeu. Quand la complémentarité est parfaite, le complexe induit alors un clivage au milieu de l'hybride miARN-ARNm entraînant la dégradation rapide de l'ARNm [42,43]. Ainsi, comme les siARN, les miARN peuvent promouvoir la dégradation de l'ARNm cible. En revanche, si cette complémentarité est imparfaite (présence de mésappariements dans la partie centrale du duplexe miARN-ARNm), une inhibition de la traduction sans dégradation de l'ARNm cible est alors observée.

### **3. Fonctions des miARN**

Les miARN sont impliqués dans les premiers stades de développement et la différenciation cellulaire. Après la découverte de lin-4 et let-7 intervenant dans le développement chez *C. elegans*, il n'a pas été surprenant de découvrir que d'autres miARN jouaient également des rôles clés dans le développement des organismes supérieurs, comme les mammifères.

La littérature reportant la découverte et l'implication de nouveaux miARN dans les processus physiologiques chez l'homme a connu et connaît toujours une croissance exponentielle (Tableau I.1).

Les quelques exemples qui suivent concernent essentiellement des miARN bien connus chez l'homme, pour leur rôle fondamental dans le développement.

L'expression de mir-143 a été reportée dans les tissus adipeux. Il est impliqué chez l'homme dans la différenciation adipocytaire par son action régulatrice sur les protéines ERK5 (extracellular signal-regulated kinase-5) [44].

MiR-16 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en favorisant l'instabilité et la dégradation des ARNm médié par les séquences riches en AU [45].

MiR-155, lui, est impliqué dans le fonctionnement du système immunitaire. Une augmentation rapide de son taux a été observé dans les lymphocytes B et T, après une exposition à un antigène, à certains médiateurs inflammatoires ou à des facteurs de transcription [46,47].

Récemment, il a été montré que certains miARN endogènes participaient aux mécanismes de défense anti-virale. Ainsi, miR-32 présente des effets inhibiteurs contre le rétrovirus PFV-1 (primate foamy virus type 1) et protège les cellules humaines de ce dernier [48].

miRNAs	Target gene	Biological functions	Species
bantam	HID	Cell death and proliferation	<i>D. melanogaster</i>
<i>let-7</i>	<i>lin-41</i> , HBL-1	Regulation of developmental timing	<i>C. elegans</i>
<i>lin-4</i>	<i>lin-14</i> , <i>lin-28</i>	Physiological condition and developmental timing	<i>C. elegans</i>
<i>lsy-6</i>	COG-1	Neuronal cell fate and developmental timing	<i>C. elegans</i>
miR-1	HAND 2	Cardiomyocyte differentiation and proliferation	<i>Mus musculus</i>
miR-7	Notch targets	Notch signaling	<i>D. melanogaster</i>
miR-14	Caspase?	Cell death and proliferation	<i>D. melanogaster</i>
miR-15a, miR-16-1	Bcl <sub>2</sub>	Down-regulated in B cell chronic lymphocyte leukemia	
miR-16	Several	AU-rich element mediated mRNA instability	<i>Homo sapiens</i>
miR-17-92	c-Myc, E2F1	Upregulated in B-cell lymphoma	<i>H. sapiens</i>
miR-32	Retrovirus PFV1	Antiviral defense	<i>H. sapiens</i>
miR-143	ERK5	Adipocyte differentiation	
miR-143, miR-145	Unknown	Downregulated in colonic adenocarcinoma	<i>H. sapiens</i>
miR-146	c-Myc, ROCK1	Development and function of immune system	<i>H. sapiens</i>
miR-155	PU-1, c-Maf	T-cell development and in innate immunity	Mouse
miR-181	unknown	Regulation of hematopoietic cell fate	<i>M. musculus</i>
miR-196	HOXA7, HOXB8, HOXC8, HOXD8	Development?	<i>M. musculus</i>
miR-223	NFI-A, MeI2c	Regulation of granulocytic maturation	<i>H. sapiens</i>
miR-273	DIE-1	Neuronal cell fate and developmental timing	<i>C. elegans</i>
miR-372, miR-373	LATS2		
miR-375	Myotrophin	Insulin secretions	<i>M. musculus</i>
miR-430	?	Brain morphogenesis	<i>D. rerio</i>
SVmiRNAs	SV40 viral mRNAs	Susceptibility to cytotoxic T cells	

Tableau I.1 : Fonctions biologiques des principaux miARN dans le règne animal.

Sur la base de ces quelques exemples, il est possible de se rendre compte du rôle fondamental joué par les miARN dans des processus physiologiques vitaux chez l'homme et les animaux.

Parallèlement à cette implication, les miARN sont également associés à de nombreuses pathologies telles que les infections virales, les maladies neurodégénératives, les cancers... Le travail de cette thèse s'inscrivant essentiellement dans le domaine de la cancérologie, les miARN liés au cancer seront prioritairement décrits dans la suite de ce chapitre bibliographique.

## 4. Dérégulation des miARN dans les cancers

### 4.1. Mécanismes de dérégulation

Au cours des dernières années, il est devenu évident que des altérations dans l'expression des miARN étaient associées au développement de pathologies. Ces altérations sont causées par une grande variété de mécanismes incluant notamment des délétions, amplifications ou mutations mettant en jeu des loci de gènes de miARN (Figure I.2).

Ainsi, ces dérégulations peuvent être le fruit d'anomalies chromosomiques. Plusieurs études menées dans ce sens : Calin et al. ont apporté la preuve que les miARN étaient souvent situés dans des régions du génome impliquées dans les processus de cancérisation [49-51].

Il peut également exister des mutations héréditaires dans les transcrits primaires, comme c'est le cas pour miR-15a et miR-16-1 dont l'expression est réduite *in vitro* et *in vivo* dans la leucémie myéloïde chronique [52].

A côté de ces altérations géniques structurales, l'expression de miARN peut être également modulée par des anomalies intervenant au niveau de leur voie de maturation.

En amont, une augmentation ou diminution de l'activité des facteurs de transcription sur les promoteurs peut provoquer des modifications des taux de l'expression des miARN. La famille des miR-34 par exemple, peut être directement induite par le suppresseur de tumeur p53 et être en partie responsable du phénotype observé [53,54].

Plus en aval, les changements d'expression de certains miARN peuvent résulter d'une altération de l'activité de Drosha ou Dicer comme c'est le cas dans différents types de tumeurs [55,56].

D'autre part, une dérégulation d'autres cofacteurs comme la protéine DGR8 nécessaire à l'action de Drosha peut également affecter l'expression de miARN avec d'importantes implications biologiques: ainsi par exemple, des souris dont le gène codant pour DGR8 a été délété, voient leur développement s'arrêter très tôt par un défaut de prolifération et différenciation cellulaires [57].

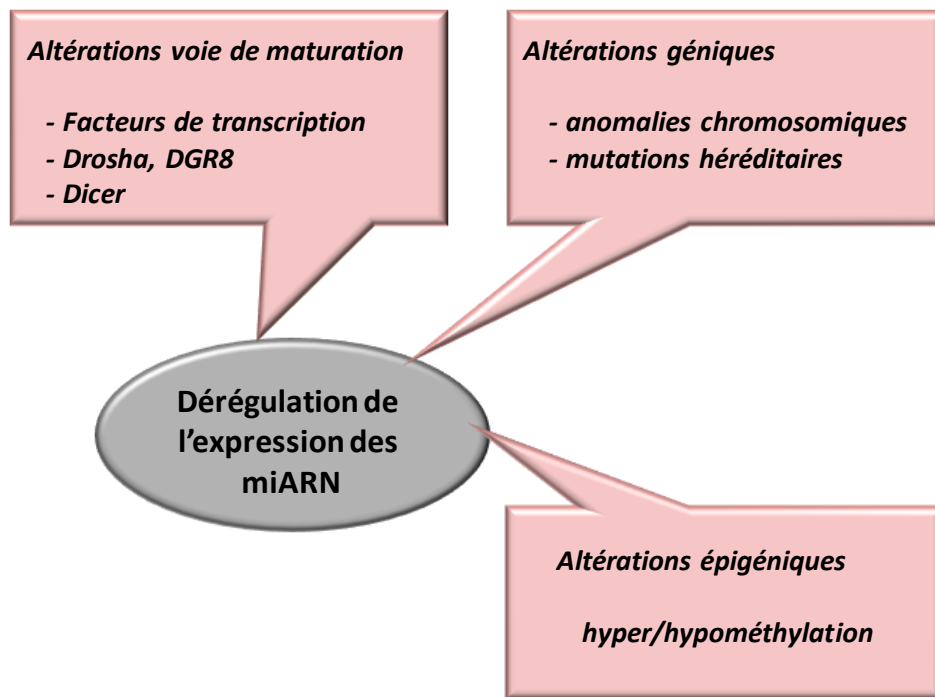


Figure I.2 : Mécanismes de dérégulation des miARN.

Des altérations épigéniques ont également pu être mises en évidence. Une analyse approfondie des séquences génomiques des miARN a montré que près de la moitié d'entre eux sont associés à des séquences riches en CpG, ce qui suggère qu'ils pourraient être soumis à un mécanisme de régulation par méthylation de l'ADN [58]. Une méthylation aberrante peut alors se traduire par une expression anormale des miARN. Ainsi par exemple, une hyperméthylation induit la modulation négative de miR-9-1 dans le cancer du sein [59] et du cluster miR-34b et miR-34c dans le cancer du côlon [60]. Inversement, une régulation positive des miARN oncogènes peut résulter d'une hypométhylation de l'ADN, comme c'est le cas de let-7a-3 dans l'adénocarcinome du poumon [61] et de miR-21 dans le cancer épithélial de l'ovaire [62].

#### 4.2. Conséquences des dérégulations

La dérégulation des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires ainsi que dans l'apoptose sont associés à l'initiation et à la progression des cancers. Ces gènes liés au développement du cancer sont définis comme oncogènes quand ils favorisent l'établissement des marqueurs de cancer (comme la prolifération cellulaire indépendante des facteurs de croissance, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion

cellulaire et les métastases...[63]) et gènes suppresseurs de tumeur ou onco-suppresseurs, quand ils leur font obstacle.

De la même manière, l'expression des miARN est profondément altérée dans de nombreuses pathologies dont les cancers où ils sont sur- ou sous-exprimés. Par analogie, on appelle miARN oncogène ou oncomiR les miARN impliqués dans la cancérisation. Ils sont généralement surexprimés dans les tissus tumoraux. Les miARN onco-suppresseurs, quant à eux, empêchent la cancérisation, en inhibant les processus qui y sont associés. Dans les cellules cancéreuses, les miARN onco-suppresseurs sont réprimés, et la levée d'inhibition qui en résulte, conduit à la progression des marqueurs de cancer (inhibition de l'apoptose, angiogenèse...) [64,65].

Ainsi certains miARN peuvent contrôler l'apoptose, ils sont appelés apoptomiR, d'autres la prolifération cellulaire, les oncomiRs, d'autres encore le développement de métastases, les métastamiR qui perturbent la néo-angiogenèse et le risque associé de diffusion des cellules tumorales [66].

Les exemples suivants illustrent l'implication de miARNs oncogènes et suppresseurs de tumeurs bien décrits dans la littérature.

- miR-21 est surexprimé dans la plupart des cancers : cancer du sein, du pancréas, du colon ou encore glioblastomes. Des études ont montré qu'il s'agissait d'un apoptomiR par le ciblage de protéines telles que PTEN et PDCD4, impliquées dans l'apoptose [67,68].

Le blocage de l'expression de miR-21 dans des lignées cellulaires de glioblastome par exemple a conduit à une activation accrue des caspases et à l'apoptose.

MiR-21 est également oncogénique et stimule l'intravasation, l'extravasation et les métastases dans différents types de tumeurs.

- le cluster miR-17-92 et miR-155, sont surexprimés dans les lymphomes et les leucémies [69]. Ce sont des oncomiR. L'infection de cellules souches hématopoïétiques par un rétrovirus contenant le cluster miR-17-92 a accéléré le développement de lymphomes chez des souris transgéniques Myc [70]. Mu et ses collègues ont montré que la suppression complète de ce cluster miR-17-92 ralentissait l'oncogenèse induite par Myc [71]. D'autre part, des études ont mis en évidence que miR-17-92 possédait des propriétés angiogéniques en réprimant le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) et la glycoprotéine antiangiogénique adhésive thrombospondine 1 (TSP1)[72].

- miR-10b, fortement exprimé dans les cellules métastatiques du cancer du sein, régule positivement la migration et l'invasion cellulaire [73]. C'est un métastamiR. Des expériences ont confirmé que la surexpression de miR-10b dans des cellules cancéreuses, induisait l'invasion et les métastases. Les auteurs ont montré que ces effets sont médiés par le ciblage direct du gène HOXD10 par miR-10b.
- miR-34a, réprimé dans plusieurs types de tumeurs, inhibe la migration et l'invasion des cellules tumorales d'hépatocarcinome humain [74]. Il s'agit d'un miARN suppresseur de tumeurs.
- Dans les cellules endothéliales, miR-221 et miR-222 répriment les propriétés prolifératives et angiogéniques de c-Kit, tandis que les signaux hypoxiques réduisent l'expression des miR-16, miR-15b, miR-20a et miR-20b, ciblant directement le VEGF, ce qui favorise le processus angiogénique [75]. Ce sont des miARN suppresseur de tumeurs.

L'expression des miARN dans une cellule cancéreuse, est spécifique d'un tissu atteint mais aussi du stade d'évolution de la maladie. De ce fait, il n'est pas toujours facile de classer les miARN dans l'une ou l'autre des catégories. De plus, un seul miARN peut réguler plusieurs gènes cibles. Ceci, couplé à l'expression tissu spécifique, un seul miARN peut agir comme un suppresseur de tumeur dans un contexte et comme un oncogène dans un autre contexte (Figure I.3).

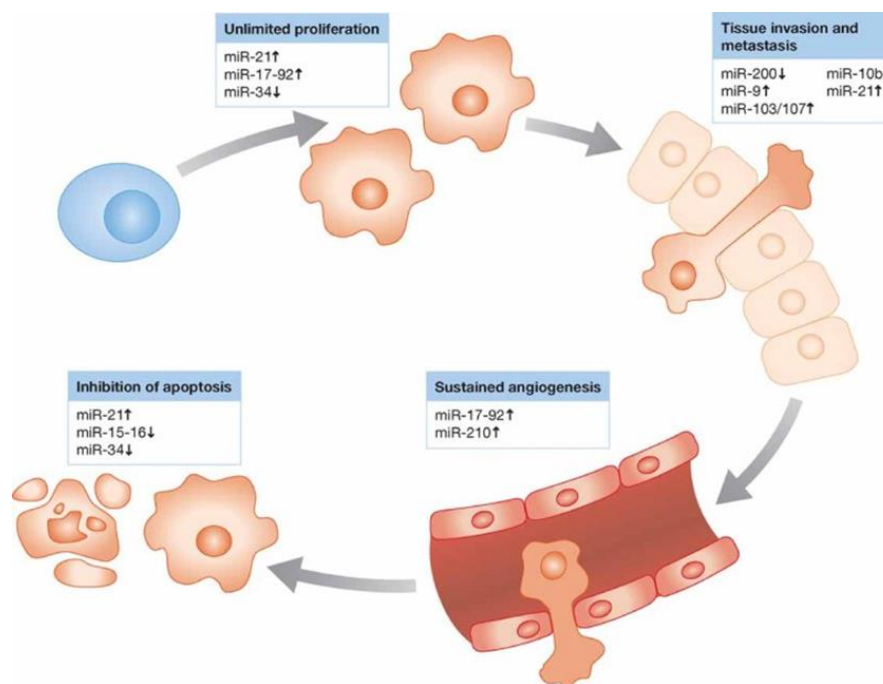


Figure I.3 : Exemple de miARN dérégulés et leur implication dans le cancer.



La distribution tissu spécifique des miARN et leur implication dans les processus de cancérisation en font des marqueurs diagnostiques et pronostiques ainsi que des cibles thérapeutiques prometteurs.

## **5. Applications biomédicales des miARN**

### **5.1. Les miARN comme outils diagnostics**

L'étude du profil d'expression d'un grand nombre de miARN (signature de miARN ou « miRNome ») par technique de microarray peut avoir un intérêt diagnostique. Des travaux ont montré que le profil d'expression des miARN d'une tumeur pouvait permettre, grâce à la capacité d'identification de l'origine embryologique, d'en préciser le type lorsque l'étude histologique est mise en défaut par son caractère très indifférencié. Elle donnerait également une information précieuse en cas de localisation métastatique d'un cancer primitif inconnu [76]. Une autre étude a pu identifier des signatures de miARN (composées de quelques miARN seulement) spécifiques de 6 types de cancer.

Les profils d'expression des miARN dans le sérum humain ont été analysés pour cinq types de cancers : prostate, côlon, ovaire, sein et poumon. Cette analyse a permis de distinguer des profils d'expression spécifiques pour le cancer du poumon et le cancer colorectal, suggérant que les miARN de la circulation pourraient fournir de véritables empreintes digitales des tumeurs malignes[77].

À titre d'exemple, des taux plasmatiques élevés de miR-92a ont été observés chez des patients ayant un cancer colorectal surexprimant miR-92a avec une sensibilité et une spécificité d'environ 80% [78,79]. Ces taux de miR-92a qui n'étaient pas retrouvés chez des sujets sains, permettaient de différencier les patients ayant un cancer colorectal des patients ayant un autre cancer digestif ou une maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

Un autre miARN, miR-145 a été identifié comme possédant un potentiel clinique en tant que nouveau biomarqueur pour le diagnostic du cancer du sein [80].

Enfin, miR-25 et miR-223 ont été indépendamment validés dans un large échantillonnage comme étant d'avantage exprimés dans le cancer du poumon [77].

## **5.2. Les miARN comme outils pronostiques**

De nombreuses études se sont intéressées à la valeur pronostique de l'expression d'un ou de plusieurs miARN dans différentes tumeurs. L'un des premiers exemples dans la littérature concerne les cancers du poumon à petites cellules dans lesquels une diminution de l'expression de let-7 est associée à un mauvais pronostic vital [81].

Dans un travail récent, les profils d'expression des miR-335 et miR-126 ont été corrélés à la survie de patients atteints de cancer du sein [82] [43]. Dans les tumeurs primaires, une faible expression de miR-335 et miR-126 conduit à des délais de rechute métastatique courts, comparativement aux patients présentant des niveaux élevés de ces miARN dans le tissu tumoral primaire. Il a parallèlement été montré que miR-335 et miR-126 régulaient un ensemble de gènes impliqués dans la formation de métastases [83].

Par conséquent, l'évaluation des niveaux d'expression de ces miRNA pourrait avoir un rôle pronostique dans le cancer du sein.

L'analyse du profil d'expression de 315 miARN (miRNome) en microarray sur une série de cancers coliques de stade II a également permis de mettre en évidence une signature de miARN capable d'identifier les patients à haut risque de récurrence tumorale après résection chirurgicale curative [84]. Parmi les miARN identifiés dans cette étude, miR-320 et miR-498 étaient ceux ayant la plus forte valeur pronostique indépendante.

## **5.3. Les miARN comme outils thérapeutiques**

L'expression aberrante des miARN associés au cancer, leur rôle en tant que suppresseurs de tumeurs, ou oncogènes, font d'eux des cibles thérapeutiques innovantes. Un miRNA spécifique peut cibler plusieurs ARNm et donc réguler la traduction de différents gènes. Cette redondance peut présenter un intérêt dans les maladies multifactorielles comme les cancers en régulant différentes voies de signalisation simultanément.

En fonction de leur profil d'expression dans un type de cancer donné, deux approches possibles ont été mises au point pour le développement d'outils thérapeutiques dans le cadre du traitement du cancer. Ces 2 approches ont pour but commun la restauration des taux normaux des miARN dont l'expression est dérégulée:

- la première approche repose sur une diminution de miARN surexprimés de type oncomiR par des stratégies d'inhibition.

- la seconde consiste en une approche de remplacement utilisée lorsqu'un miARN onco-suppresseur se trouve réprimé.

### 5.3.1. Stratégies d'inhibition

Différentes stratégies ont été développées incluant des oligonucléotides antisens anti-miARN, des petites molécules inhibitrices, des éponges à miARN, ou encore des masques de miARN [85]. Les oligonucléotides anti-miARN peuvent bloquer stériquement les interactions entre les miARN et leur cible ARNm en venant s'hybrider de manière compétitive par reconnaissance de type Watson et Crick sur les miARN cibles. Des anti-miR-21 ont ainsi induit, par blocage de miR-21 surexprimés, une inhibition de la croissance de cellules MCF-7 *in vivo* [86]. Ces différentes stratégies sont présentées dans la Figure I.4.

L'inhibition de miARN peut également être réalisée en agissant sur leur voie de maturation. Dans une étude récente, la capacité de petites molécules à bloquer miR-21 a été recherchée conduisant à l'identification d'un azobenzène comme inhibiteur efficace de l'expression de miR-21[87].

Une autre stratégie visant à bloquer les miARN consiste à développer des ARNm synthétiques comportant de multiples sites de liaison des miARN ciblés. De tels systèmes ont été qualifiés d'éponges à miARN, capables de piéger les miARN surexprimés [88].

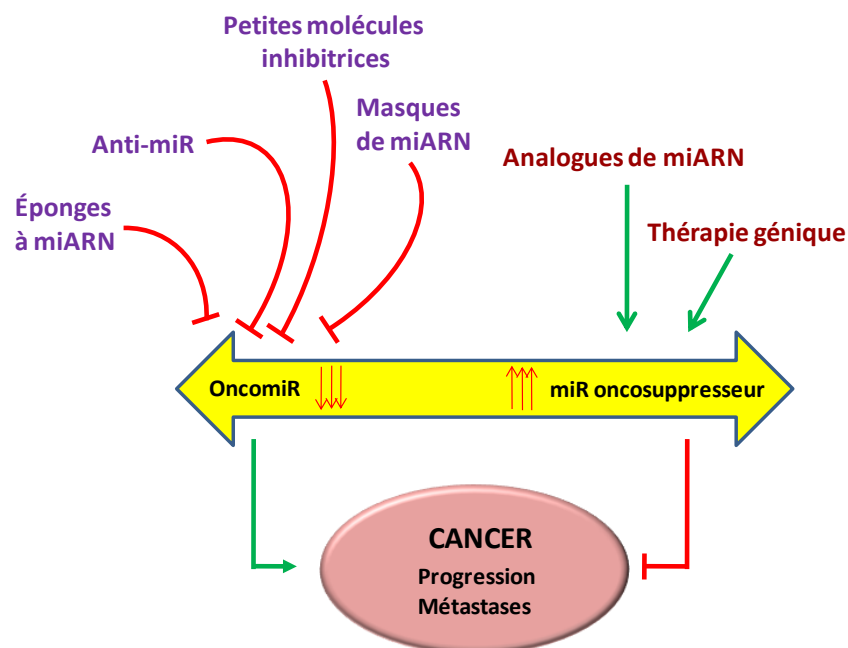


Figure I.4: Stratégies thérapeutiques impliquant les miARN.

Enfin une dernière approche a été proposée basée sur l'utilisation de masques de miARN [89]. Cette stratégie se rapproche de la première utilisant des oligonucléotides anti-miARN, cependant, dans ce cas, les masques de miARN sont des oligonucléotides qui n'interagissent pas directement avec les miARN ciblés mais qui vont s'hybrider sur la partie 3' non traduite des ARNm avec une complémentarité complète masquant ainsi les sites de liaison des miARN. Dans un modèle de rat, des masques de miARN complémentaires des gènes HCN2 et HCN4 ont bloqué l'effet des miARN correspondants miR-1 et miR-133 [90].

Globalement, l'efficacité des oligonucléotides thérapeutiques (anti-miARN, éponges à miARN, masques de miARN) dépend de leur capacité à diffuser dans l'organisme et à résister à la dégradation enzymatique. Des modifications chimiques peuvent améliorer considérablement la stabilité des oligonucléotides et augmenter leur stabilité thermique lors de l'hybridation avec l'ARN cible. Ainsi par exemple, dans le cadre de l'étude des oligonucléotides anti-miARN, de nombreuses modifications ont été développées et évaluées. Elles sont résumées dans la Figure I.5 :

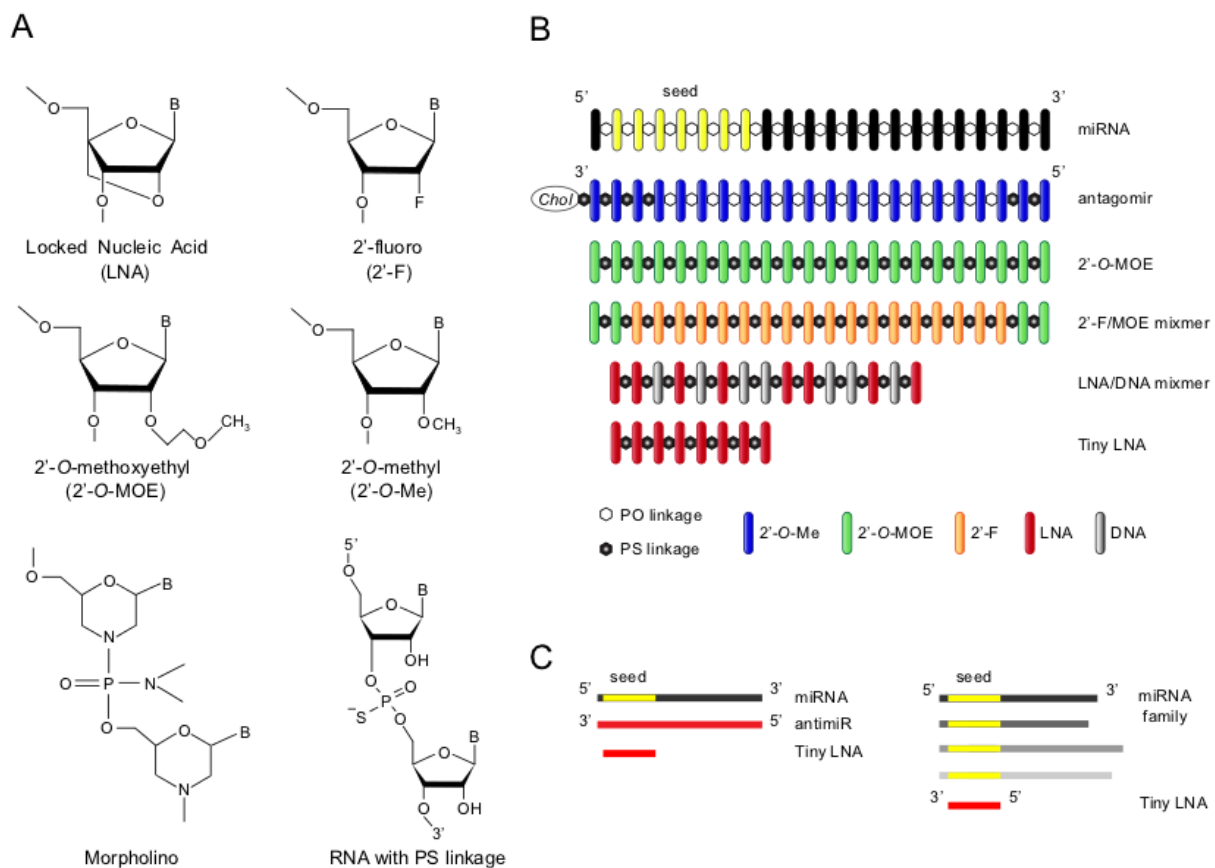


Figure I.5 : (A) Modifications chimiques les plus souvent utilisées, (B) anti-miARN décrits dans la littérature, (C) Approches d'inhibition par des anti-miARN (anti-miR entièrement complémentaires ou « tiny LNA » ciblant la séquence graine.

Au niveau des bases nucléiques, les principales modifications concernent l'hydroxyle en 2' du ribose avec l'introduction de groupes 2'-*O*-méthyle (2'-OMe), 2'-*O*-méthoxyéthyle (2'-MOE), 2'-*deoxy-2'fluoro arabinonucleic acid* (2'-Fluoro), et les *Locked Nucleic Acids* (LNA) [91].

Le squelette phosphodiester peut être remplacé par un squelette phosphorothioate (PS) qui, bien que diminuant l'affinité de l'oligonucléotide antisens (OA) pour sa cible ARN, confère une grande résistance aux nucléases. C'est pourquoi, certaines molécules possèdent des liens phosphorothioates aux extrémités seulement (antagomiR). Des squelettes de type morpholino ont également été utilisés mais beaucoup plus rarement. Dans cette approche anti-miARN, les molécules sont généralement complètement complémentaires du miARN cible mais une nouvelle famille de petits inhibiteurs les « tiny » a récemment été décrite. Ce sont des oligonucléotides de petite taille complémentaires de la séquence « graine » des miARN et qui possèdent des nucléotides modifiés de type LNA [92]. Ils présentent l'avantage de pouvoir bloquer une famille entière de miARN qui posséderait la même séquence « graine ». Les molécules oligonucléotidiques antisens de petites tailles peuvent cependant présenter le désavantage d'être moins affines pour leur cible et éventuellement moins spécifiques.

### **5.3.2. Stratégies de remplacement**

Puisque l'expression de suppresseurs de tumeur peut empêcher la croissance de la tumeur, il a été proposé que le rétablissement de miARN onco-suppresseurs puisse également avoir un effet anti-tumoral. Les stratégies de remplacement de miRNA reposent sur la restauration des gènes basée sur l'utilisation d'un vecteur viral (thérapie génique) ou sur l'augmentation du taux de miARN par l'apport exogène d'analogues [93].

Des études ont montré que la surexpression du miARN onco-suppresseur Let-7 pouvait inhiber la croissance de cellules tumorales pulmonaires, hépatiques et pancréatiques [94]. De plus l'administration systémique de miR-26a *via* l'utilisation d'un adénovirus dans un modèle animal de carcinome hépatocellulaire a permis d'inhiber la progression tumorale sans toxicité apparente [95]. Malgré la réussite de cette étude, les risques liés à l'utilisation de vecteurs viraux ne peuvent pas être totalement exclus. Une autre stratégie est basée sur l'utilisation d'analogues synthétiques de miARN [96]. Dans de récents travaux, l'utilisation d'analogues de miARN pour restaurer les taux des suppresseurs de tumeurs miR-34a et let-7, a induit un bénéfice thérapeutique chez la souris avec une diminution significative de la croissance tumorale.

### **5.3.3. Exemples d'essais cliniques**

Les études concernant les miARN, ont augmenté de manière exponentielle ces dernières années et ont permis de mettre en lumière la myriade de possibilités qu'offrent ces petites molécules en termes de diagnostic, pronostique et thérapeutique.

Des groupes pharmaceutiques pionniers sur le sujet ont lancé des études de développement de candidats médicaments inhibiteurs ou analogues de miARN, et ce dans divers domaines tels que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les troubles neurologiques, les infections virales ... [97].

Cet intérêt se matérialise notamment par la centaine d'essais cliniques en cours évaluant l'utilisation de miARN comme biomarqueurs ou médicaments (<http://clinicaltrials.gov/>). Les médicaments et autres dérivés à base de miARN constituent déjà 49% des brevets américains relatifs aux miARN.

En 2008, une société pharmaceutique de premier plan du nom de Santaris annonçait le début des essais cliniques du SPC3649, une molécule anti-miARN à base de nucléotides LNA dirigée contre miR-122, pour le traitement de l'hépatite C [97]. Des études ont montré que miR-122 était impliqué dans la réplication du virus de l'hépatite C (VHC), ainsi que dans la synthèse du cholestérol [98]. En raison de son expression spécifique dans le foie et de ses applications potentielles, miR-122 est devenu une cible privilégiée pour la première génération de thérapie basée sur les miRNA. Aujourd'hui, bien qu'il soit encore en phase II d'essais cliniques, le LNA-antimir-122 (Miravirsén, Santaris Pharma) est un succès et constitue un fort espoir pour l'entrée de nouvelles molécules ciblant les miARN en essais cliniques.

Rosetta Genomics en collaboration avec le Centre Columbia University Medical a proposé son premier test diagnostique qui permet, dans le cadre du cancer du poumon, de distinguer les cellules squameuses et non squameuses.

GlaxoSmithKline et Regulus Therapeutics ont formé une alliance pour le développement de nouveaux médicaments basés sur les miARN dans le traitement des maladies inflammatoires.

Asuragen a lancé le premier test diagnostique de miRNA. Il est conçu pour faire un diagnostic différentiel entre le cancer du pancréas et la pancréatite, qui ont souvent des symptômes similaires. Des résultats remarquables ont été obtenus avec 95% des échantillons identifiés avec précision.

MiRagen a annoncé son intention de se concentrer sur l'identification de cibles associées à des maladies cardio-vasculaires principalement liées à l'insuffisance cardiaque.

Les récents essais précliniques et cliniques sur la base de la thérapie miRNA sont résumés dans le [Tableau I.2 \[99\]](#).

Therapeutic indication	Pharmacology	Target	Status	Technology
<b>Santaris Pharma</b> ( <a href="http://www.santaris.com/">http://www.santaris.com/</a> )				
Hepatitis C virus infection	miRNA inhibitor	miR-122	Phase II	Locked nucleic acids
Hypercholesterolaemia				
<b>miRagen Therapeutics</b> ( <a href="http://www.miragentherapeutics.com/">http://www.miragentherapeutics.com/</a> )				
Chronic heart failure	miRNA inhibitor	miR-208/499	Predinical	Chemical modifications
Post-myocardial infarction remodeling	miRNA inhibitor	miR-15/195	Predinical	
Polycythemia vera	miRNA inhibitor	miR-451	Predinical	
Peripheral arterial disease	miRNA inhibitor	miR-92	Lead optimization	
Cardiometabolic disease	miRNA inhibitor	miR-378	Lead optimization	
Cardiac fibrosis	miRNA mimic	miR-29	Lead optimization	
<b>Mima Therapeutics</b> ( <a href="http://www.mirnarx.com/">http://www.mirnarx.com/</a> )				
Cancer	miRNA mimic	let-7; miR-34; miR-16	Lead optimization	Chemical modifications; lipid-based vehicles
<b>Regulus Therapeutics</b> ( <a href="http://www.regulusrx.com/">http://www.regulusrx.com/</a> )				
Kidney Fibrosis	miRNA inhibitor	miR-21	Predinical	Phosphorothioate backbone; nucleotide analogs
Hepatitis C virus infection	miRNA inhibitor	miR-122	Predinical	
Atherosclerosis	miRNA inhibitor	miR-33	Predinical	
Hepatocellular carcinoma	miRNA inhibitor	miR-21	Predinical	

Tableau I.2 : miARN en développement et essai clinique.

Le développement de médicaments basés sur les miARN est très difficile en raison du manque d'expérience, et les études en sont encore à leurs débuts. Cependant les résultats déjà obtenus sont prometteurs et ouvrent de grandes perspectives dans la thérapie des cancers.

D'autre part, ces candidats médicaments ont également montré un intérêt comme chimiosensibilisants en association avec d'autres molécules antitumorales classiquement utilisées dans les protocoles de chimiothérapie. Ces molécules innovantes à structure oligonucléotidique capables de réguler les taux de miARN font partie, comme les anticorps monoclonaux ou les inhibiteurs de tyrosine kinase des thérapies ciblées.

## 6. Focus sur miR-21

miR-21 est un oncomiR qui a été retrouvé associé à de nombreux cancers et qui représente un marqueur diagnostique, pronostique et une cible thérapeutique pertinente. Compte tenu de son importance, un chapitre lui a été dédié.

## 6.1. Biogénèse

Chez l'Homme, miR-21 est localisé sur le chromosome 17q23.2 [100]. Après transcription, il subit la voie de maturation classique des miARNs telle que décrite précédemment. La Figure I.6 présente la séquence de miR 21.

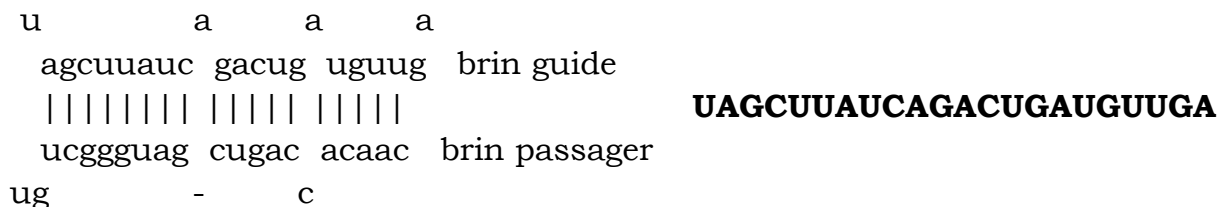


Figure I.6 : Séquence de mir-21 (double brin mature et brin guide seul).

## 6.2. Apoptose et principaux gènes ciblés par miR-21

Des dizaines de gènes ciblés par miR-21 ont été identifiés et leurs fonctions dans le cancer analysées. Il a été montré que ces cibles jouaient un rôle clé dans presque tous les phénomènes biologiques induisant le développement des tumeurs et principalement dans l'apoptose [67,68].

### 6.2.1. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène physiologique naturel qui intervient quand les cellules vieillissent ou sont endommagées. Cependant, dans de nombreuses cellules cancéreuses, le processus apoptotique est perturbé, permettant aux cellules de survivre et de proliférer avec un ADN endommagé ou muté [101].

L'apoptose est activée par deux voies: une voie intrinsèque ou mitochondriale et une voie extrinsèque induite par des ligands de mort qui se lient à des récepteurs à la surface des cellules. Les deux voies aboutissent finalement à l'activation des caspases, des protéases qui constituent les principaux effecteurs de l'apoptose. Ces enzymes participent aux nombreux événements protéolytiques qui ont lieu dans une cellule en apoptose, aboutissant au clivage de substrats protéiques jouant un rôle clé dans les fonctions cellulaires (protéines du cytosquelette, protéines nucléaires ou enzymes de réparation de l'ADN, protéines kinases..). Lors de l'apoptose, il y a une redistribution des phospholipides membranaires avec une translocation des phosphatidylsérines qui passent du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Ces phosphatidylsérines permettent la reconnaissance puis l'épuration des cellules en apoptose par les macrophages, évitant ainsi l'apparition d'une réaction inflammatoire.



### 6.2.2. Principaux gènes ciblés par miR-21

MiR-21 peut cibler et réguler de nombreux gènes impliqués dans les processus de cancérisation, de migration et d'invasion cellulaire. PDCD4 et PTEN constituent les cibles les mieux connues [102].

#### -PDCD4

La protéine PDCD4 (programmed cell death 4) se lie au facteur protéique eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) pour réguler la traduction, agissant ainsi comme un suppresseur de tumeur.

Des études ont pu montrer une régulation négative de la protéine PDCD4 induite par la surexpression de miR-21 *via* le ciblage direct de la partie 3' non traduite de l'ARNm de cette protéine. L'inhibition de PDCD4 par miR-21 a pu être mise en évidence dans les cellules colorectales, de carcinome du col utérin et de glioblastome induisant des processus de cancérisation. Une étude a montré que la protéine AP-1 (activator protein 1) est un facteur de transcription qui induit l'expression de miR-21 en réponse à la signalisation de Ras. Par cette voie, Ras inhibe PDCD4 mais également PTEN (Phosphatase and TENsin homolog).

#### -PTEN

La protéine PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) est une phosphatase qui a un effet suppresseur de tumeur. Elle inhibe la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) par déphosphorylation. Dans le cancer du sein, PTEN contrôle le cycle cellulaire et l'apoptose.

Le gène PTEN est muté ou même absent dans de nombreuses tumeurs solides. Dans les cellules cancéreuses hépatiques l'inhibition de miR-21 induit une augmentation de PTEN entraînant une diminution de la prolifération des cellules tumorales, ainsi que de leur migration. De même, la transfection de miR-21 dans des cellules saines a provoqué une augmentation de leur migration. La régulation de l'expression de PTEN par miR-21 se fait par interaction directe au niveau de la partie 3' non traduite de l'ARNm correspondant.

La [Figure I.7](#) présente les différentes cibles de miR-21 ainsi que leur implication dans le cancer.



Figure I.7 : cible de miR-21 et leur implication dans le cancer.

### 6.3. miR-21 dans les cancers

MiR-21 a d'abord été identifié comme un facteur anti-apoptotique dans le glioblastome. Puis une étude à grande échelle des profils d'expression de ce miARN, a montré que c'était le seul miARN régulé à la hausse de façon ubiquitaire dans toutes les tumeurs. Ces dernières années, de nombreuses études ont mis l'accent sur les aspects biologiques et fonctionnels de miR-21 dans de nombreux cancers dont le cancer du sein, le glioblastome, le carcinome hépatocellulaire, le cancer du poumon, de l'œsophage, de l'estomac, colorectal, de la prostate...

Les données expérimentales indiquent que miR-21 joue un rôle crucial dans la prolifération des cellules tumorales, l'apoptose et l'invasion cellulaire. L'inhibition de miR-21 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de l'apoptose et la chimiosensibilité accrue aux agents antitumoraux soulignant le rôle oncogène joué par miR-21 dans la plupart des cancers chez l'homme.

### 6.4. miR21 comme marqueur diagnostique et pronostique

La détection de miR-21 dans le sang est corrélée à une expression fortement élevée de ce miARN dans les tumeurs, suggérant qu'il pourrait être utilisé comme biomarqueur dans des tests diagnostiques [103]. D'autre part, une augmentation des taux de miR-21 est non seulement le signe de la présence d'une tumeur mais peut également révéler la progression de la maladie. En effet, plus les niveaux de miR-21 sont élevés, plus les tumeurs sont à un stade avancé de développement. Dans les gliomes par exemple,

une surexpression de ce miARN est associée à la progression tumorale. Dans le cancer du sein, du colon et du pancréas, il traduit un stade clinique avancé caractérisé par des métastases ganglionnaires.

Toutefois, il existe de rares exemples où le pronostic ne s'aggrave pas avec la surexpression de miR-21. Dans les carcinomes gastriques dans lesquels miR-21 peut servir de marqueur diagnostique, des niveaux élevés dans la tumeur ont été associés à un meilleur pronostic et une meilleure survie sans récurrence. L'explication de ce profil particulier reste encore à déterminer.

### **6.5. Ciblage de miR-21 par des anti-miARN**

Compte tenu de sa surexpression dans un grand nombre de cancers chez l'homme et de ses propriétés oncogènes, miR-21 constitue une cible thérapeutique prometteuse. Des inhibiteurs de miARN comme les anti-miARN ont été développés afin de rétablir des taux physiologiques de miR-21 dans les cellules tumorales. Ces études ont montré que des anti-miARN comportant des motifs LNA et plus récemment des tiny LNA avaient une efficacité validant cette approche thérapeutique [104].

Dans les lignées cellulaires de gliomes, l'inhibition de miR-21 a conduit à l'activation des caspases, entraînant la diminution de la prolifération des cellules tumorales et l'augmentation de l'apoptose. A la suite de ces premiers résultats, de nouvelles expériences ont été menées pour étudier les effets des inhibiteurs de miR-21 co-administrés avec des traitements antitumoraux classiques [105]. Ces associations ont montré un effet synergique.

MiR-21, surexprimé dans de nombreux cancers constitue donc un marqueur diagnostique et pronostique ainsi qu'une cible thérapeutique avérée.

## **II. Les oligonucléotides amphiphiles (ONA)**

Les oligonucléotides basés sur les miARN possèdent un fort potentiel thérapeutique comme nous l'avons vu dans la partie précédente. Cependant leur utilisation est limitée par la nature même de ces molécules qui sont polyanioniques et de haut poids moléculaire. Elles traversent très difficilement la membrane plasmique des cellules qui constitue une véritable barrière.

De ce fait, il est nécessaire d'utiliser un système de vectorisation pour leur permettre d'être internalisées et d'atteindre leur cible cytoplasmique.

Des travaux ont néanmoins montré une activité antisens *in vivo* de certains anti-miARN utilisés sans vectorisation, et il faut relever le succès d'études cliniques menées sur des oligonucléotides modifiés phosphorothioate, 2' O-methoxyethyl ou LNA [106]. Cependant, les effets thérapeutiques de ces molécules sont obtenus pour des doses élevées qui peuvent induire des toxicités.

Malgré ces quelques exemples d'utilisation d'oligonucléotides nus notamment *in vivo*, la nécessité de développer des stratégies de vectorisation pour donner tout leur potentiel thérapeutique à ces molécules est devenue une évidence.

## 1. Stratégies de vectorisation des oligonucléotides

Différentes approches ont été développées au cours de ces dernières années (Figure I.8). Elles incluent des stratégies virales basées sur l'utilisation de vecteurs viraux et des stratégies non virales exploitant des méthodes physiques (électroporation, ultrasons...) et des vecteurs synthétiques.

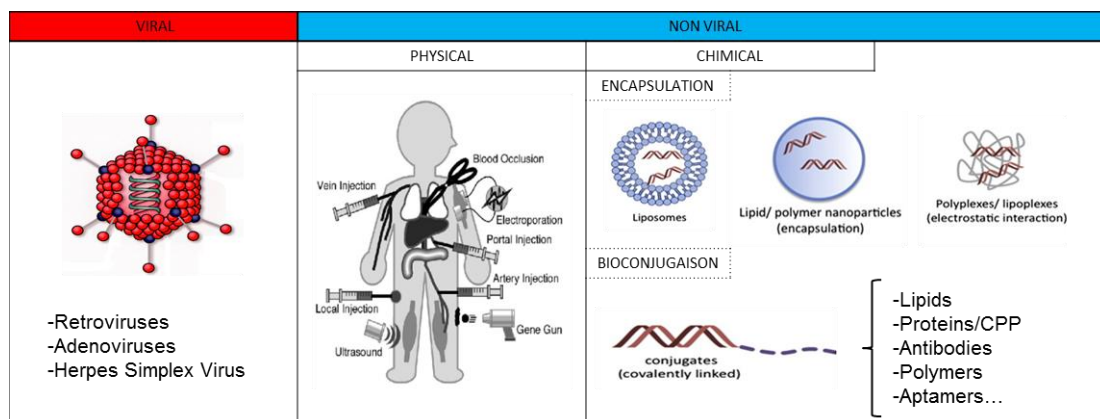


Figure I.8 : Quelques exemples de méthodes de vectorisation des oligonucléotides.

Les vecteurs viraux sont très efficaces mais sont capables d'induire une toxicité potentielle à ne pas négliger, limitant leur utilisation *in vivo*.

Parmi les stratégies non virales, le développement de vecteurs ou véhicules synthétiques est très étudié et deux principales stratégies sont utilisées :

- La première est basée sur la mise en place d'interactions entre les oligonucléotides à transporter et les véhicules, l'ensemble formant des

lipoplexes ou des polyplexes organisés en nanosystèmes comme des liposomes, des nanosphères ou des nanocapsules...[107].

- La seconde repose sur la formation d'une liaison covalente entre le véhicule et l'oligonucléotide à transporter, les deux partenaires constituant un bioconjugué [108,109].

## **2. Intérêt des ONA**

Le développement des oligonucléotides amphiphiles (ONA) s'inscrit donc dans cette seconde approche de bioconjugaison. Dans ce cas, les oligonucléotides qui constituent des molécules hydrophiles sont couplés à des véhicules hydrophobes et les bioconjugués résultants présentent des propriétés amphiphiles.

Il existe différents types d'ONA en fonction de la nature chimique des véhicules couplés. Ainsi, on compte dans la famille des ONA, des oligonucléotides conjugués à des peptides [110,111], des polymères [112] mais surtout des lipides. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux ONA lipides.

Les membranes cellulaires agissent comme une barrière sélective qui régule l'entrée de molécules dans les cellules. Les membranes sont composées d'une bicouche principalement phospholipidique à caractère hydrophobe empêchant l'entrée de molécules hydrophiles dans les cellules. Les oligonucléotides sont des molécules très hydrophiles en raison de la présence des sucres et du squelette phosphate ionisé au pH physiologique. Réduire le caractère anionique ne suffit pas à améliorer l'internalisation cellulaire des oligonucléotides car des études ont montré que même avec un squelette neutre (dérivés morpholino ou oligonucléotides peptidiques), leur pénétration cellulaire reste mauvaise.

La conjugaison à des véhicules lipidiques a été utilisée pour donner un caractère hydrophobe aux oligonucléotides dans le but de favoriser l'interaction avec la membrane plasmique et par la suite d'améliorer la pénétration cellulaire.

## **3. Stratégies de synthèse**

Dans la synthèse des ONA, les lipides sont le plus souvent couplés aux extrémités 3' et 5' en raison notamment de leur facilité d'accès [113,114]. Cependant, des bioconjugués en positions internes c'est à dire au milieu de la séquence oligonucléotidique, sur les bases nucléiques, en 2' du ribose ou encore au niveau des liaisons phosphodiester ont également été décrits

[115]. Les modifications sur la base nucléique doivent être choisies avec soin pour ne pas que l'hybridation éventuelle avec une séquence complémentaire soit compromise.

La bioconjugaison des oligonucléotides est délicate parce qu'elle peut provoquer des changements subtils dans la structure des molécules et modifier leurs propriétés biologiques. Par conséquent, les sites spécifiques pour la conjugaison doivent être déterminés avec soin.

L'obtention d'un ONA passe d'abord par la synthèse de l'oligonucléotide qui est caractérisé par un enchaînement précis d'acides nucléiques. La préparation des oligonucléotides est réalisée sur un synthétiseur automatique et en phase solide, par l'incorporation successive d'unités de synthèse qui permet l'élongation de la chaîne oligonucléotidique. Ces synthons contiennent les nucléobases à incorporer et possèdent une fonction phosphoramidite qui permet le couplage des bases entre elles *via* la formation de liens phosphodiester.

De nombreuses approches synthétiques ont été développées pour préparer des bioconjugués oligonucléotidiques. Elles peuvent être rassemblées en deux stratégies générales selon le moment où la réaction de bioconjugaison est réalisée:

- si le couplage entre les deux partenaires se fait sur support solide au cours de la synthèse automatisée de l'oligonucléotide, on parle de stratégie pré-synthétique
- si le couplage a lieu à la fin de la synthèse de l'oligonucléotide sur les molécules liées ou non au support, on parle plutôt de stratégie post-synthétique.

### **3.1. Stratégie pré-synthétique**

La bioconjugaison sur le support est réalisée par l'incorporation de phosphoramidites particuliers au cours de la synthèse automatisée de l'oligonucléotide [116]. Ces phosphoramidites sont modifiés et contiennent la molécule à coupler, ici le lipide.

Cette méthode de couplage par des phosphoramidites modifiés est classiquement utilisée pour la conjugaison de glucides, de molécules lipophiles, d'antibiotiques, de vitamines, de marqueurs fluorescents et de groupes polyéthylène glycols (PEG). De nombreux synthons modifiés sont commerciaux mais la synthèse de phosphoramidites personnalisés peut être réalisée.

Cependant, la méthode est limitée à des molécules stables dans les conditions utilisées au cours de la synthèse automatisée des oligonucléotides. Le conjugué préparé ne doit pas se dégrader dans les conditions de déprotection faites à la fin de la synthèse.

Ainsi, cette approche, même si elle est très utile, est compliquée quand les molécules à coupler présentent des chimies incompatibles, comme ça peut être le cas pour les oligonucléotides et les peptides. Dans le cas des bioconjugués lipidiques, cette stratégie est souvent utilisée et facilitée par la commercialisation de phosphoramidites hydrophobes. Mais ceux-ci concernent le plus souvent des molécules lipidiques classiques comme le cholestérol. La bioconjugaison avec des lipides plus originaux nécessite donc de les synthétiser en laboratoire.

### **3.2. Stratégie post-synthétique**

La bioconjugaison en solution peut se faire après synthèse complète de l'oligonucléotide.

Les oligonucléotides sont clivés de leur support solide, déprotégés et purifiés avant d'être mis en réaction avec les molécules lipidiques, dans le solvant et dans les conditions appropriées. Après la réaction de couplage, une seconde étape de purification est nécessaire pour obtenir l'ONA pur.

Dans certaines conditions, la réaction de couplage peut avoir lieu sur les oligonucléotides fixés sur leur support solide. Après la bioconjugaison, l'ONA est clivé du support, déprotégé et purifié. Cette stratégie qui évite la purification intermédiaire de l'oligonucléotide n'est possible que si les molécules à coupler supportent les conditions de déprotection utilisées.

Le principal avantage de la bioconjugaison en solution est de permettre le couplage de molécules chimiques incompatibles avec les conditions utilisées dans le synthétiseur automatique. Les 2 fragments peuvent être synthétisés, purifiés et caractérisés individuellement puis couplés en utilisant la chimie la plus efficace possible.

Malgré des rendements plus faibles, la bioconjugaison en solution est de plus en plus largement utilisée, notamment grâce au développement de réactions chimiosélectives et régiosélectives telles que la chimie-clic incluant les réactions de Diels-Alder, la ligation de Staudinger ou encore la cycloaddition 1,3-dipolaire [117].

### **3.3. Chimie de bioconjugaison**

Différentes réactions de couplage peuvent être utilisées, conduisant à des types variés de liaisons, réversibles ou irréversibles. Les principales réactions mises en jeu dans la bioconjugaison des oligonucléotides en solution sont présentés dans la [Figure I.9](#). Elles incluent la formation de liens amides, amine, thiourée, thiazolidine ...

Parmi ces liens certains seront clivables de façon pH dépendant (hydrazones par exemple) d'autres de façon redox dépendant (ponts disulfures), d'autres encore de façon enzyme dépendant (liens amides coupés par les cathépsines lysosomales). La recherche de liens clivables est justifiée par le fait que la coupure de la liaison entre l'oligonucléotide qui porte l'activité biologique et la partie conjuguée peut améliorer l'activité biologique en facilitant l'accès à la cible biologique.

Ces dernières années, l'utilisation de la chimie clic et en particulier la cyclo-addition 1,3-dipolaire a montré son efficacité pour la modification des oligonucléotides. Elle se déroule en effet dans l'eau, est sélective et permet l'obtention des molécules attendues avec de bons rendements. Les liens triazoles obtenus sont irréversibles et conduisent à des bioconjugués stables.



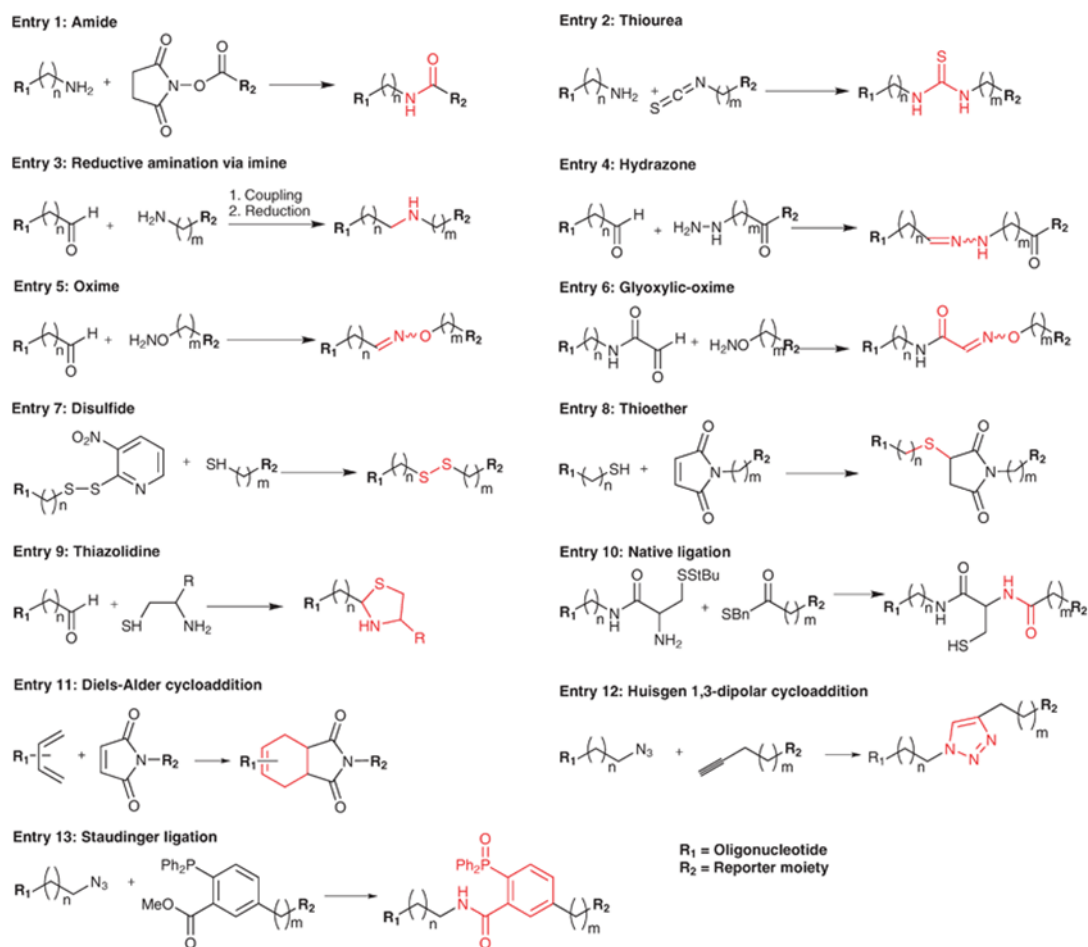


Figure I.9 : Principales réactions de couplage utilisées pour la bioconjugation des oligonucléotides.

### 3.4. Bioconjugaison par chimie clic

Le concept de chimie clic a d'abord été décrit par Barry Sharpless du Scripps Research Institute en 2001 [118]. La Chimie clic est un ensemble de réactions qui doit répondre à un certain nombre de critères comme une stéréospécificité, une purification simple, des rendements élevés. Ils sont présentés dans la figure suivante (Figure I.10).

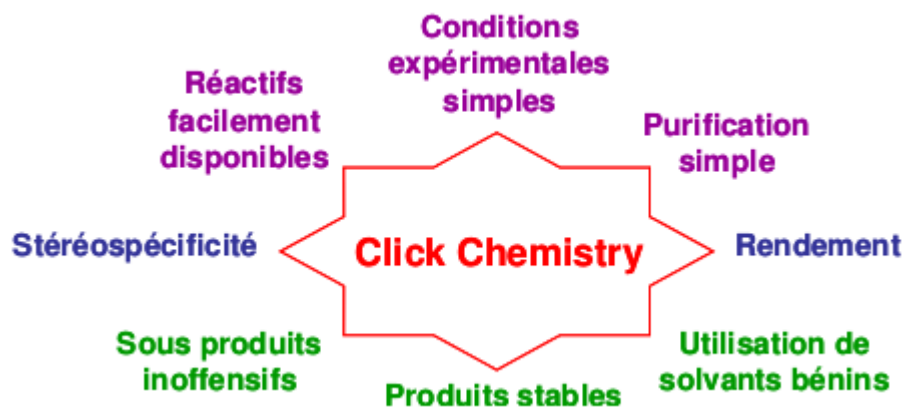


Figure I.10 : Caractéristiques des réactions de chimie clic

Ce concept, donnant accès à des variations quasi illimitées dans l'architecture moléculaire, est rapidement devenu un outil de choix pour le développement de nouvelles biomolécules. La réaction la plus fréquemment citée est la cyclo-addition 1,3-dipolaire qui conduit à la formation de composés de type 1,2,3-triazole en faisant réagir un alcyne terminal et un azoture (Figure I.11).



Figure I.11 : Schéma général de la réaction de cyclo-addition 1,3-dipolaire.

### 3.4.1 . Cyclo-addition 1,3-dipolaire catalysée par le Cuivre (CuAAC)

L'ensemble des réactions de cyclo-addition entre des molécules portant des groupements alcynes et azide a été appelé « chimie clic » en 1963 par Huisgen. Malgré leur simplicité et sélectivité, ces réactions ont été abandonnées à cause des conditions drastiques de température et de pression et du manque de régiosélectivité. Ce concept a été repris et optimisé *via* l'ajout d'un catalyseur, le Cuivre (I) qui a permis d'obtenir une bonne sélectivité et de diminuer l'énergie d'activation de la réaction [119]. La découverte de la catalyse par le Cu(I) a fait de la cyclo-addition 1,3-dipolaire, une des réactions les plus utilisées pour la bioconjugaison.

L'utilisation de la cyclo-addition catalysée par le cuivre, dite CuAAC pour «Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition» a suscité un immense intérêt ces dernières années, se traduisant par un nombre de publications en croissance exponentielle. Elle a été employée dans une gamme extraordinaire de contextes biologiques et chimiques, tels que le marquage de macromolécules par des sondes fluorescentes, le marquage *in vivo*, l'immobilisation de protéines, d'ADN ou ARN pour l'élaboration de biopuces, la fonctionnalisation de nanoparticules, ou encore la chimie des polymères.

Cette diversité d'applications a été possible grâce à l'orthogonalité de cette réaction vis-à-vis d'autres structures et groupes fonctionnels tels que les esters, les acides carboxyliques, les alcènes, les alcools et les amines, généralement présents dans la chimie du vivant.

A ce jour la CuAAC a été largement étudiée et plusieurs protocoles avec leurs systèmes catalyseurs-solvants ont été proposés. De façon générale, la réaction a lieu dans l'eau additionnée de solvants organiques alcooliques (*ter*-Butanol) ou non (DMSO, DMF, THF...). Il existe plusieurs méthodes permettant d'avoir des ions Cu(I) dans le mélange réactionnel comme la génération *in situ* par réduction de sels de Cu(II) en présence d'un agent réducteur : l'ascorbate de sodium ou l'introduction directe de Cu(I) par l'emploi d'une solution de bromure ou d'iode de cuivre (CuBr ou CuI). Dans ce cas, il est nécessaire d'utiliser un ligand qui jouera le rôle de stabilisant du Cu(I) tout en promouvant le mécanisme de catalyse. Le ligand le plus souvent utilisé est le TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine). La réaction peut être réalisée à température ambiante ou à température élevée et assistée ou non par des microondes. Les temps réactionnels peuvent varier de 5 minutes à 48 heures selon le protocole et les réactifs utilisés.

Le cycle catalytique proposé par Sharpless *et al.* en 2005 (Figure I.12) commence par la formation d'un complexe Cu-acétylide, suivi d'un complexe acétylide-azoture qui se cyclise en formant un métallo-cycle intermédiaire. Une fois le triazole formé, il y a régénération du catalyseur par coupure de la liaison Cu-C [120].

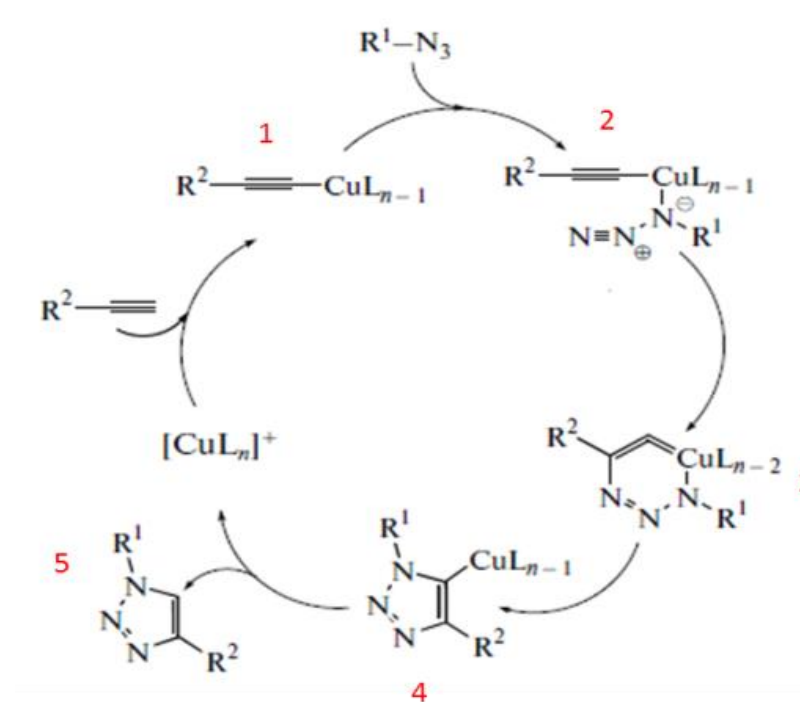


Figure I.12 : Mécanisme proposé pour la catalyse par le cuivre (I)

Dans le domaine de la chimie des acides nucléiques, la CuAAC a été utilisée pour la première fois par l'équipe de Seo en 2003 lors de la modification de bases avec des sondes fluorescentes pour le séquençage automatisé d'ADN[121] (Figure I.13).

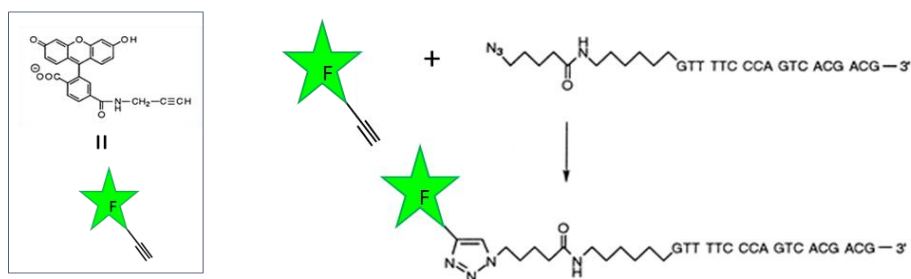


Figure I.13 : Exemple de l'utilisation de la chimie-clic CuAAC pour le marquage fluorescent d'acides nucléiques.

Par la suite, la CuAAC a été utilisée pour le couplage d'acides nucléiques dans le but de former des dimères et même des oligomères de petites tailles. Ceci a donné à la formation d'oligonucléotides à squelette triazole [122] (Figure I.14).

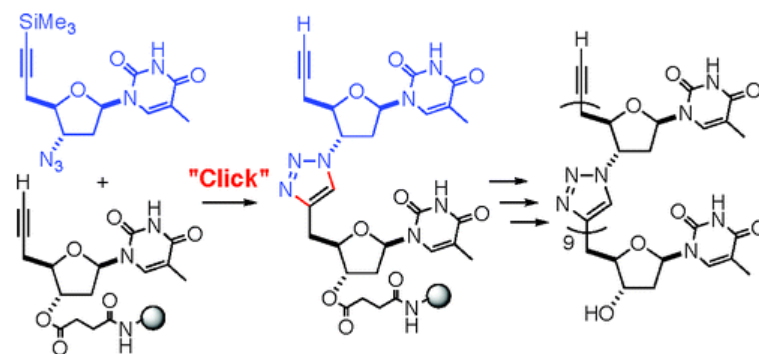


Figure I.14 : Exemple de l'utilisation de la chimie-clic CuAAC pour la synthèse d'un oligonucléotide.

De même, elle a été mise en œuvre pour réaliser des réactions intramoléculaires telle que la cyclisation de brins d'ADN, décrite par l'équipe de Kumar en 2007 [123] (Figure I.15).



Figure I.15 : Exemple de l'utilisation de la chimie-clic CuAAC pour la cyclisation d'ADN.

Pour illustrer les nombreuses applications de la CuAAC dans le domaine de la chimie acides nucléiques, il faut citer l'emploi de cette réaction pour la bioconjugaison de protéines, de sucres, de polymères ou encore de lipides. La contribution de la chimie-clic dans l'obtention de cette diversité de bioconjugués a été significative. A titre d'exemple, le travail récent de Averick SE *et al.* paru en 2012 peut être souligné. La CuAAC a permis de bioconjuguer un polymère et une protéine luminescente sur des brins complémentaires d'ADN [124]. L'hybridation des deux brins a conduit à la formation d'une molécule hybride protéine-ADN-polymère constituant un nouveau système de détection basé sur le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (*Fluorescence resonance energy transfer, FRET*).

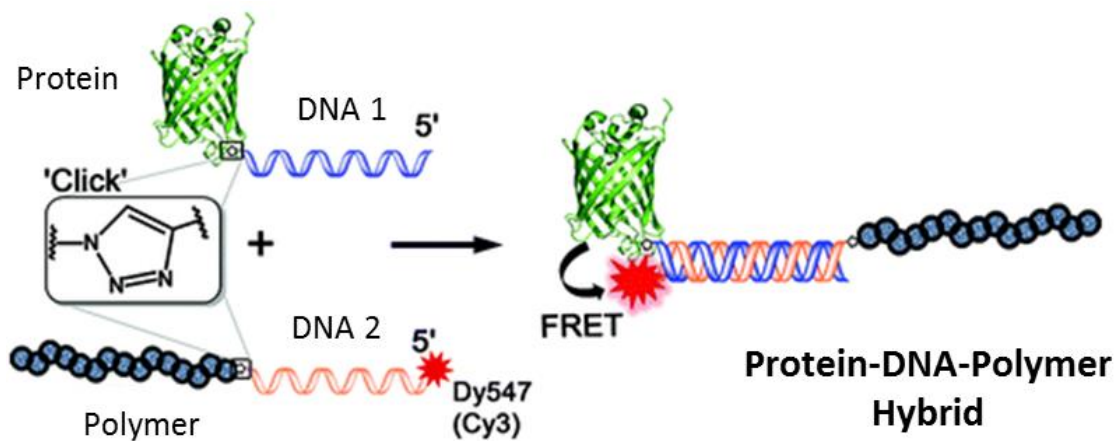


Figure I.16 : Exemple de l'utilisation de la chimie-clic CuAAC pour la bioconjugaison de polymères et de protéines sur des oligonucléotides.

### 3.4.2 .Cyclo-addition 1,3-dipolaire sans cuivre, avec des cyclooctynes (SPAAC)

Malgré l'efficacité *in vitro* de la CuAAC pour la fonctionnalisation de biomacromolécules, les effets négatifs du cuivre ont considérablement limité son utilisation dans le cadre d'applications *in vivo*. En effet, sur les cellules de mammifères, la présence de cuivre a souvent été jugée néfaste ce qui a motivé le développement de protocoles de cyclo-addition sans la présence de ce catalyseur.

Dans ce contexte, Bertozzi *et al.*, ont décrit en 2007 la cyclo-addition 1,3-dipolaire sans cuivre. Pour cela, ils ont synthétisé des cyclooctynes dans lesquels la forte tension de cycle est un moyen efficace d'abaisser la barrière d'activation de la cyclo-addition Azide-alcyne [125]. Cette chimie clic qui utilise les cyclooctynes pour réaliser la cyclo-addition 1,3-dipolaire, a été baptisée SPAAC pour « Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition » (Figure I.17).

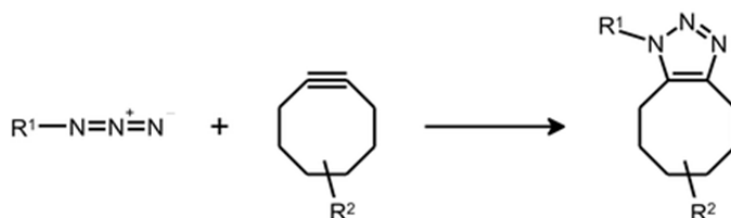


Figure I.17: Exemple d'une cyclo-addition avec des cyclooctynes, SPAAC.

La tension de cycle a été combinée à la carence en électrons pour augmenter la réactivité des molécules et pour promouvoir ces réactions de

bioconjugaison. Ainsi, la présence de groupes électroattracteurs peut encore améliorer l'efficacité de la réaction.

Des cyclooctynes monofluorés (MOFO) et difluorés (DIFO) ont été préparés dans ce sens, pour augmenter la vitesse grâce à l'ajout de substituants électro-attracteurs [126].

Par la suite, Boons *et al.* ont synthétisés le dibenzocyclooctynol (DIBO) dans lequel le noyau cyclooctyne est entouré de deux cycles aromatiques. Ils ont pu montrer une réactivité accrue des azides pour la cyclo-addition en raison de la tension de cycle, renforcée par l'addition des cycles aromatiques [127].

Une dernière amélioration a été apportée sur le DIBO par le groupe de Bertozzi, par l'incorporation d'une liaison amide dans le noyau cyclooctyne. La résonance de la fonction amide entraîne une tension supplémentaire sans créer de nouvelle insaturation qui conduirait à une molécule instable. De plus, l'ajout d'un hétéroatome sur le noyau cyclooctyne améliore la solubilité et la pharmacocinétique de la molécule. Ceci a conduit au biarylazacyclooctynone (BARAC), qui est un composé d'une très forte réactivité et qui possède également l'hydrophilie nécessaire pour effectuer la cyclo-addition *in vivo* [126]. La Figure I.18 montre quelques exemples de cyclooctynes utilisées pour les réactions SPAAC.

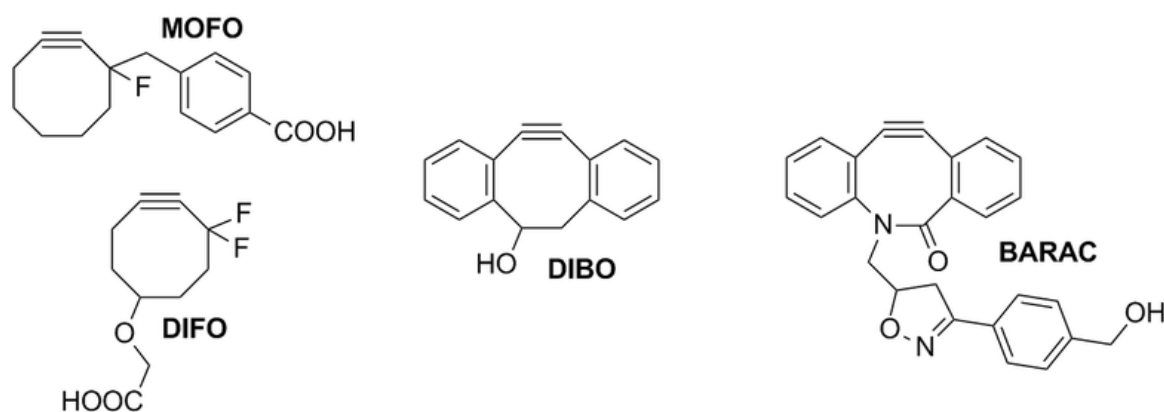


Figure I.18: Exemple de familles de cyclooctynes utilisées pour les réactions SPAAC.

Ces cyclooctynes fonctionnalisées ont été utilisées dans différentes applications biologiques, comme le marquage de cellules vivantes (Figure I.19). La modification covalente directe de biomolécules par des sondes fluorescentes a ainsi pu être réalisée chez la souris [126].

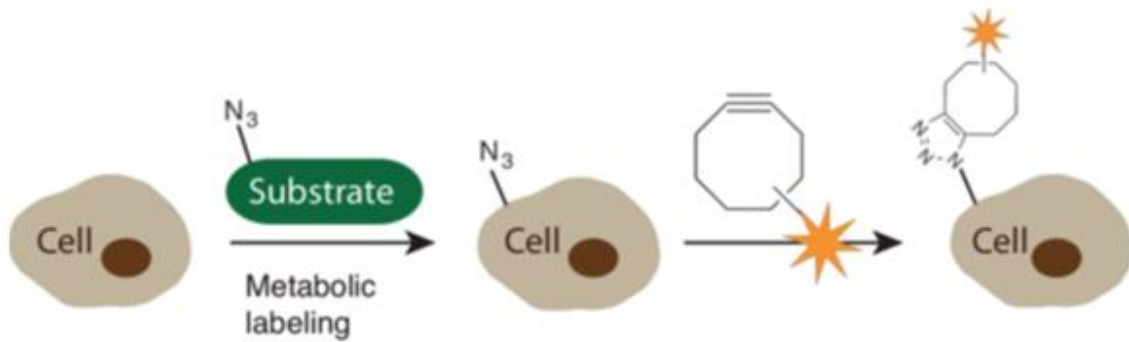


Figure I.19 : Bio-marquage de cellules par cyclo-addition 1,3-dipolaire catalysé par des cyclooctynes. Les cellules sont traitées avec des substrats métaboliques azoture qui sont ensuite détectés avec une sonde cyclooctyne.

Concernant l'ADN, deux exemples de réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire par des cyclooctynes peuvent être cités :

- Celui de Shelbourne *et al.* qui ont réalisé des ligations de l'ADN[128] (Figure I.20).

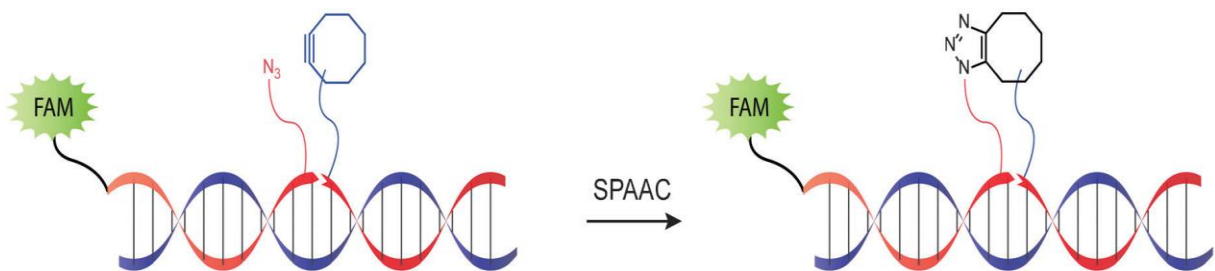


Figure I.20 : Ligation d'ADN par l'intermédiaire d'une réaction de cyclo-addition médiée par une cyclooctyne.

- celui d'Isaac S. Marks *et al.* qui ont utilisé des oligonucléotides modifiés par des cyclooctynes comme amorces dans des réactions de PCR pour le marquage fluorescent des segments amplifiés résultants [129] (Figure I.21).

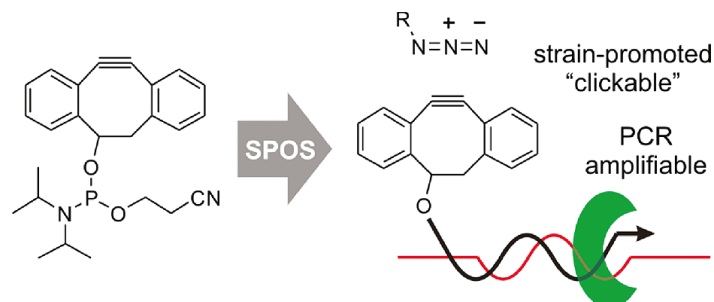


Figure I.21 : Phosphoramidite DIBO utilisé pour la modification d'amorce PCR.



Comme nous venons de le voir à travers tous ces exemples, la chimie clic et plus particulièrement la cyclo-addition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre ou basé sur des cyclooctynes est une chimie particulièrement adaptée à la bioconjugaison des oligonucléotides.

## 4. Impacts de la bioconjugaison

### 4.1. Sur l'organisation supramoléculaire

Les ONA ont été étudiés pour leurs propriétés d'agrégation en solution aqueuse. La plupart d'entre eux ont la capacité de s'auto-assembler dans l'eau notamment grâce aux effets hydrophobes qui ont lieu entre les résidus lipidiques [130].

Différents types d'agrégats peuvent être formés par les ONA selon des modèles souvent observés pour des tensioactifs classiques. Il s'agit d'organisation en micelles, en bicouches... (Figure I.22)

C'est le cas notamment des ONA constitués de résidus cholestérols qui ont montré des structures en forme de micelles, coexistant avec de plus petits agrégats, avec une cinétique d'agrégation assez lente d'après Baglioni et ses collègues [131].

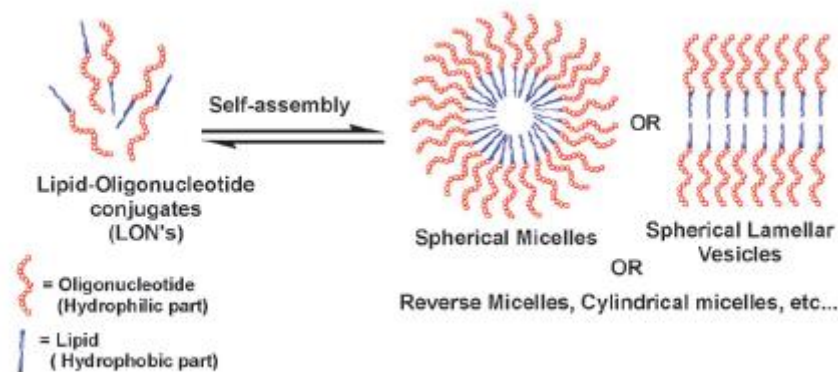


Figure I.22 : Exemples d'organisations supramoléculaires des ONA.

Malgré la taille relativement petite de la partie hydrophobe par rapport à la partie hydrophile constituée par l'oligonucléotide, les ONA sont capables de s'auto-organiser en fonction de la balance hydrophilie/hydrophobie. Il n'existe pas de réponse définitive quant à la taille minimale de la partie hydrophobe qui permettrait ces phénomènes d'agrégation mais avec des oligonucléotides d'une vingtaine de base, des chaînes lipidiques d'au moins 12 carbones (dodécane) sont requises [132].

Beaucoup de facteurs physiques tels que la force ionique, la température, ou encore le pH peuvent influencer sur l'auto-assemblage des ONA [133].

#### **4.2. Sur les propriétés d'hybridations**

L'utilisation des oligonucléotides, quelles que soient les applications, exploite généralement leurs propriétés d'hybridations avec des séquences complémentaires par appariement de type Watson-Crick. Par conséquent, la conjugaison du résidu hydrophobe ne doit pas compromettre la formation des duplexes.

L'impact de la chaîne lipidique, sur la reconnaissance du brin complémentaire et la formation du duplexe, n'est pas toujours le même. La modification hydrophobe peut être à l'origine d'une stabilisation ou au contraire d'une déstabilisation du duplexe. Des études décrivent également une absence d'impact. Ces stabilisations ou déstabilisations sont évaluées par la mesure de la température de fusion ( $T_m$ ) du duplexe (le principe sera détaillé dans le chapitre III).

Ces différents travaux ont permis de mettre en évidence que l'activité de stabilisation ou de déstabilisation dépendait surtout de la position modifiée par rapport à la séquence ciblée. Il est intéressant de remarquer que le duplexe formé par un ONA présentant un lipide en milieu de séquence ne sera pas nécessairement plus déstabilisé que le même duplexe dans lequel l'ONA est modifié en position terminale.

Notons que les variations dans la valeur de la température de fusion ( $T_m$ ) restent relativement faibles et correspondent le plus souvent à des évolutions de  $\pm 5$  °C par rapport au  $T_m$  de l'oligonucléotide non bioconjugué correspondant. De plus importantes stabilisations des duplexes ont été décrites par Letsinger et al. entre deux ONA complémentaires, où le  $T_m$  pouvait varier de plus de 20°C [134].

### **5. Applications**

#### **5.1. Délivrance cellulaire**

Les ONA ont été utilisés avec succès dans différentes stratégies antisens et notamment *in vivo* chez les souris et les primates avec les antogomiR. Les capacités d'auto-assemblage des ONA et leur incorporation dans les membranes influent sur la pénétration cellulaire et la distribution *in vivo*.

Il faut souligner que les ONA lipidiques sont principalement exploités

dans le contexte d'un ciblage hépatique, étant donné leur interaction potentielle avec les lipoprotéines du sérum et leur pénétration dans les hépatocytes par le biais de l'endocytose médiée par des récepteurs aux lipoprotéines. C'est le cas notamment du cholestérol ou du tocophérol. La présence de ces récepteurs sur les membranes cellulaires est remarquablement corrélée à la pénétration des ONA-cholestérol [135,136].

Néanmoins, l'ancrage des ONA dans les membranes cellulaires ou les endosomes pourrait altérer les activités biologiques des séquences d'oligonucléotides. Les structures d'ONA doivent être optimisées de façon à, à la fois, favoriser la pénétration cellulaire et conserver leur capacité de chargement par le complexe RISC.

Dans le domaine des miARN, l'inhibition de la surexpression de miARN oncogènes par l'utilisation d'antagomiR (ONA-cholestérol) a été exploitée. Les antagomiR sont des anti-miARN, disposant de la séquence complémentaire du miARN à cibler, conjugué à un résidu cholestérol. Initialement décrits pour l'inhibition de miR-122 dans le foie, les antagomiR ont récemment été utilisés pour inhiber miR-10b dans un modèle de tumeur mammaire chez la souris, conduisant à l'inhibition de la formation de métastases. Cette étude a montré que les ONA-cholestérol pouvaient favoriser l'internalisation des oligonucléotides dans des cellules autres que des hépatocytes.

Ces deux exemples soulignent l'intérêt des antagomiR dans le traitement des cancers. Ils ont la capacité, en fonction du miARN ciblé, de réduire la croissance rapide des cellules tumorales *in vivo* et de prévenir la formation de métastases.

Il est important de noter qu'à côté des antagomiR qui sont des ONA-cholestérol, il n'y a pas d'études reportant l'utilisation d'inhibiteurs ou d'analogues de miARN bioconjugués à d'autres types de lipides.

## **5.2. Fonctionnalisation de surface**

Aux applications purement biomédicales des ONA, comme la délivrance des oligonucléotides, s'ajoute des applications dans le domaine des nanotechnologies pour la fonctionnalisation de surface. Les ONA sont alors ancrés, *via* leur résidu lipidique, dans des membranes par effet hydrophobe.

Dans ce système moléculaire, les ONA doivent conserver leur capacité de reconnaissance spécifique d'un oligonucléotide complémentaire.

Le travail de Letsinger *et al.* peut être cité en exemple. Il concerne le rapprochement de vésicules codé par la complémentarité de séquences existant entre des ONA-cholestérol ancrés dans la membrane de liposomes [137,138].

Cette stratégie a été conçue pour l'agrégation déclenchée de liposomes par appariement entre des ONA complémentaires. Au début de l'expérience, les liposomes sont fonctionnalisés avec des oligonucléotides amphiphiles portant un résidu cholestérol à chaque extrémité. Ces deux résidus lipidiques restent ancrés à la surface des liposomes. Lors de l'incubation avec les brins complémentaires, un des deux cholestérols est expulsé de la membrane pour permettre l'hybridation des deux oligonucléotides. Cette hybridation à la surface des liposomes déclenche leur agrégation et leur sédimentation (Figure I.23).

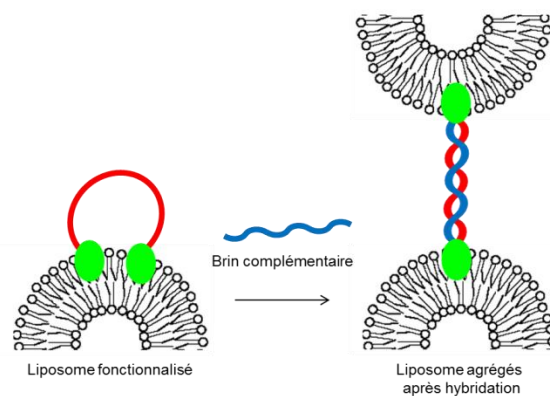


Figure I.23 : Exemple de fonctionnalisation de liposomes avec des ONA et hybridation à la surface.

Récemment, Baglioni et al. ont utilisés les ONA pour la construction d'origami à la surface de liposomes POPC [139]. Il s'agissait de nanostructures d'ADN pseudo-hexagonales greffées dans les bicouches lipidiques par le biais d'un résidu cholestérol. Les hexagones d'ADN ont été assemblés facilement à température ambiante par l'hybridation de séquences complémentaires ajoutés de manière séquentielle (Figure I.24). Ces liposomes décorées d'ADN pseudo-hexagonaux sont structurellement stable ce qui constitue un réel avantage pour leur exploitation.

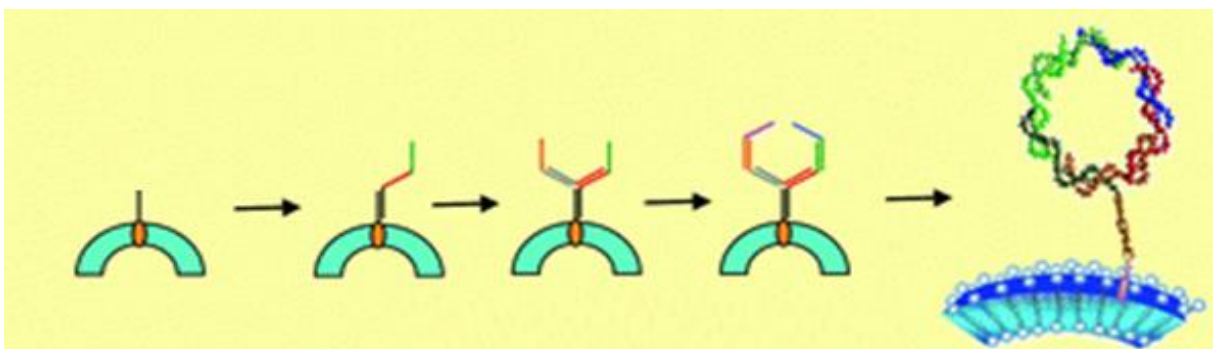


Figure I.24 : Construction et ancrage de structures en origami à la surface de liposomes grâce à des ONA.



**PARTIE II :**  
**CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES**  
**OLIGONUCLEOTIDES AMPHIPHILES**

---

## I. Conception des ONA

Une molécule amphiphile est une molécule possédant à la fois une partie hydrophile polaire et une partie hydrophobe, ce qui lui confère une double affinité, pour l'eau et pour les solvants organiques.

Dans ce travail de thèse nous avons développé des ONA lipidiques. Ces molécules résultent de la bioconjugaison entre un oligonucléotide, constituant la partie hydrophile et une molécule lipidique constituant la partie hydrophobe. Le couplage entre ces deux entités s'est fait de manière covalente.

Dans la conception des ONA, il faut distinguer trois parties différentes qui sont : l'oligonucléotide, la molécule hydrophobe et le lien par lequel sont unies ces 2 partenaires (Figure II.1).



1. Oligonucléotide, 2. Lien, 3. Lipide, 4. Liaison clivable

Figure II.1 : Design d'un oligonucléotide amphiphile.

L'oligonucléotide est la partie de la molécule qui porte l'activité biologique. Ainsi le choix des oligonucléotides dans cette thèse a été guidé par les différentes applications auxquelles ils étaient destinés. Une grande variété d'oligonucléotides se distinguant par leurs séquences, la nature chimique des bases nucléiques, la structure mono ou bi-caténaire ont été synthétisés. Le point commun à tous ces oligonucléotides réside dans leur finalité puisqu'ils ciblent tous des miARN en tant qu'inhibiteurs de miARN (Cf chapitre III) ou analogues de miARN (Cf chapitre IV).

La diversité des molécules amphiphiles obtenues est issue de la variation de différents paramètres:

- la structure chimique des lipides utilisés
- leurs positions dans la séquence
- leur nombre dans la séquence c'est-à-dire le ratio lipide/oligonucléotide.

La bioconjugaison des lipides sur les oligonucléotides a reposé sur deux stratégies de synthèse :

- La formation d'un lien phosphodiester par l'utilisation de réactions de couplage classiques avec des phosphoramidites fonctionnalisés
- La formation d'un lien triazole par l'exploitation de la chimie clic *via* des cyclo-additions 1,3-dipolaires catalysées par le cuivre.

Ces réactions de bioconjugaison ont conduit à la formation de liens covalents irréversibles. Cependant, dans certains cas des liens clivables formés de ponts disulfures ont été également préparés. Ce type de conjugaison permet de libérer la molécule active *in cellulo* renforçant son efficacité.

Dans ce chapitre, les différentes méthodologies utilisées pour la préparation des ONA ont été décrites incluant la synthèse de l'oligonucléotide lui-même puis celle du bioconjugué.

## II. Les oligonucléotides

### 1. Choix des séquences nucléotidiques

Le choix des séquences oligonucléotidiques a été fait en fonction des différentes applications auxquelles ils étaient destinés. Deux grandes familles d'oligonucléotides ont été synthétisées :

- des molécules simple brin, complémentaires des miARN à cibler. Ce sont des **anti-miARN**. Leurs séquences ont été synthétisées avec des bases nucléotidiques ADN et LNA. Ces oligonucléotides ont servi à la mise en place de la plateforme de détection de miARN basée sur les Quantum Dots (Cf chapitre III).
- des molécules double brin, dont la structure est similaire à celle des miARN à cibler. Ce sont des **analogues de miARN**. Ils ont été synthésés avec des bases ARN et 2'OMe. Les séquences complémentaires ont été préparées séparément puis hybridées pour former des structures bicaténaires. Ces oligonucléotides ont servi à la mise en place de la plateforme de délivrance basée sur la sérum albumine humaine (Cf chapitre IV).

Toutes les séquences oligonucléotidiques ont été décrites en détail dans les chapitres suivants.

### 2. Synthèse des oligonucléotides

Un oligonucléotide est un court polymère d'acides nucléiques reliés par des liaisons phosphodiesters, dont la longueur varie généralement d'une



dizaine à une cinquantaine de bases. Les oligonucléotides peuvent être d'origine naturelle et formés par clivage de segments d'ADN ou d'ARN plus longs.

Dans un contexte de développement de molécules à visée thérapeutique, les oligonucléotides sont maintenant plus couramment synthétisés, ce qui offre la possibilité d'une diversité quasi-illimitée. De plus, cette approche synthétique autorise l'introduction de modifications chimiques purement artificielles (2'OMe, 2'Fluoro, LNA...) afin d'améliorer la résistance et l'efficacité des acides nucléiques lors de leur utilisation, comme cela a été évoqué dans le chapitre précédent.

La synthèse des oligonucléotides, entièrement automatisée, a été réalisée au laboratoire. Elle se fait sur support solide, dans le sens 3' → 5', par la méthode classique des phosphoramidites.

Les premières synthèses d'oligonucléotides datant des années 50 étaient réalisées en solution à l'aide de nucléosides modifiés par des groupements chlorures de phosphoryles ou encore phosphorochloridates. Les réactions de couplage relativement longues, conduisaient à des intermédiaires peu stables et susceptibles d'être hydrolysés. De plus cette méthode de synthèse en solution nécessitait des étapes de purification entre les cycles.

La synthèse en phase solide a ensuite été développée. Elle présente un certain nombre d'avantages par rapport à la synthèse en solution: l'utilisation d'un grand excès de réactifs, l'élimination d'impuretés et de réactifs par simples lavages et l'absence de purification entre chaque étape du cycle de synthèse. La méthode des phosphoramidites, mise au point par Marvin Caruthers [140] au début des années 1980, renforcée par l'utilisation de la phase solide et l'automatisation, est ainsi devenue la méthode de choix de synthèse des oligonucléotides et c'est celle qui a été utilisée dans ce travail.

## **2.1. Support solide**

La synthèse automatisée a pour point de départ un support solide constitué de particules insolubles de 50 à 200 µm de diamètre, sur lequel est greffé le premier nucléoside (Figure II.2). De nombreux types de support solide ont été utilisés, comme les billes de polystyrène ou les billes de silice à porosité contrôlée (CPG pour *controlled pore glass*) Ces supports en verre à porosité contrôlée sont mécaniquement robustes et couramment utilisés dans la synthèse des oligonucléotides courts car ils assurent une grande efficacité de couplage, un excellent rendement et une bonne reproductibilité. Ce sont ceux qui ont été choisis.

La sélection du support solide est importante, d'une part dans la mesure où les rendements de synthèse, en fonction de la longueur du brin à synthétiser, vont dépendre de sa taille et de sa porosité; d'autre part, parce qu'il possède la première base de la séquence oligonucléotidique.

De plus, les supports peuvent porter des modifications comme des groupes fluorescents, pour le marquage des oligonucléotides en position 3' ou du cholestérol pour la bioconjugaison de parties hydrophobes à l'extrémité 3'. Les supports CPG qui ont été utilisés dans ce travail proviennent essentiellement de deux fournisseurs : LinckTechnology ou Glen Research.

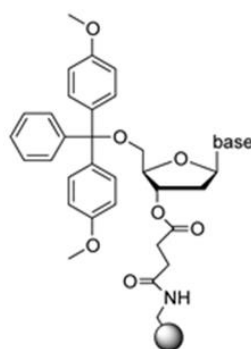


Figure II.2 : Support solide CPG fonctionnalisé par un nucléoside.

## 2.2. Phosphoramidites

Le phosphoramidite est un nucléotide modifié qui constitue l'unité de base utilisée pour l'élongation de la chaîne oligonucléotidique. La structure générale d'un phosphoramidite est présentée dans la [Figure II.3](#).

Les groupements réactifs du nucléotide, alcools et amines, sont protégés par différents groupes protecteurs ([Figure II.4](#)):

- Les fonctions amines primaires sont protégées par un groupement benzoyl ( $N^6$ adénosine,  $N^2$ cytidine) ou isobutyl ( $N^2$ guanosine). La thymidine ne nécessite pas de protection car elle ne comporte pas de groupement amine primaire.
- la fonction 5'OH du sucre est protégée par un groupement diméthoxytrityl (DMT)
- la fonction 3'OH du sucre est estérifiée par un acide phosphorique lié, d'une part, à un groupement cyanoéthyl ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{N}$ ) et d'autre part, à un groupement N di-isopropylamine ( $\text{N}(\text{iPr})_2$ ).
- dans le cas des ARN, la fonction 2'OH est protégée par un groupe tertbutyldiméthylsilyle.

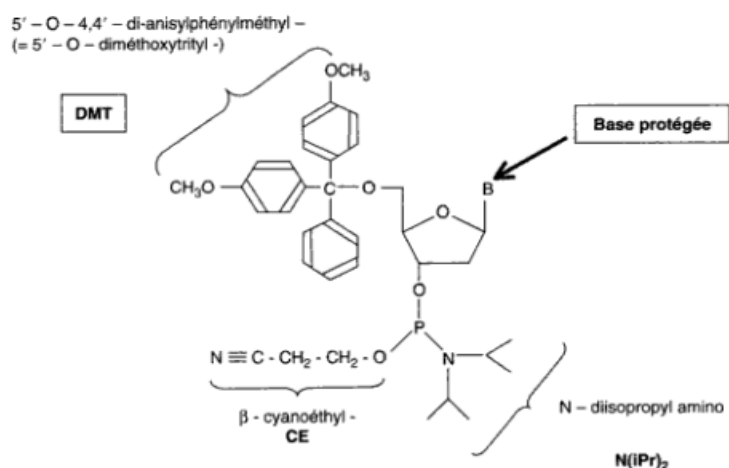


Figure II.3 : Structure d'un phosphoramidite en série ADN.

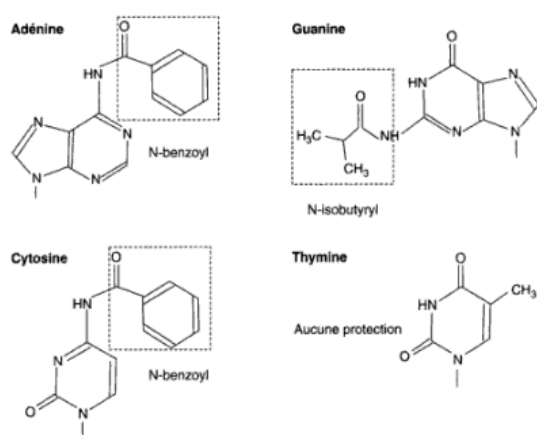


Figure II.4 : Modification des bases pour la synthèse des oligonucléotides.

De cette manière, tous les groupements réactifs sont protégés. Au fur et à mesure de la synthèse, ils sont libérés au moment opportun.

Les phosphoramidites utilisés dans ce travail pour la préparation des oligonucléotides sont tous commerciaux et proviennent de trois fournisseurs en fonction de leurs chimies respectives (Figure II.5):

- Link Technology pour les phosphoramidites ADN, ARN, 2'OMe
- Link Technology et Glen Research pour les phosphoramidites ADN
- Exiqon pour les phosphoramidites LNA.

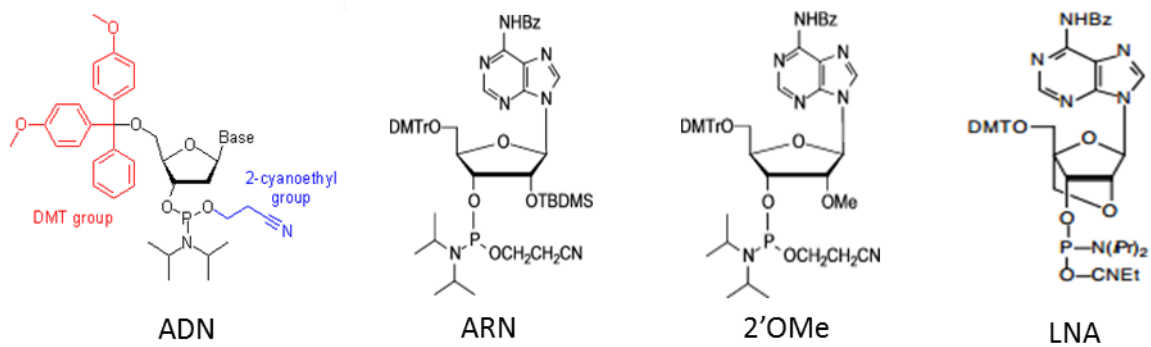


Figure II.5: Structure générale d'un phosphoramidite et exemples commerciaux.

Un autre nucléoside modifié par un groupement octadiyne en position 5 de la base (uridine) a également été utilisé dans la synthèse de nos oligonucléotides (Figure II.6). Cette fonction alcyne a servi par la suite à réaliser des réactions chimiques de cyclo-addition 1,3-dipolaire pour l'étape de bioconjugaison. Ce phosphoramidite provient de Baseclick.

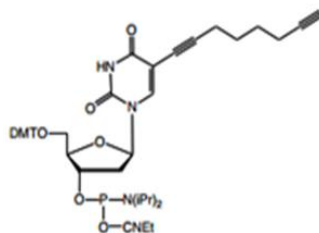


Figure II.6 : Nucléotide alcyne.

L'approche phosphoramidite n'est pas exclusivement utilisée pour l'incorporation de nucléotides durant la synthèse oligonucléotidique. Elle permet aussi l'incorporation de sondes fluorescentes. En effet il existe une grande diversité de phosphoramidites commerciaux pour le marquage des oligonucléotides.

Deux phosphoramidites porteurs de groupes fluorescents ont été utilisés dans cette thèse. Il s'agit de la Fluorescein-CE Phosphoramidite (6-FAM) de chez Link technology et du 3'-TAMRA (Rhodamine) CPG provenant de Glen Research (Figure II.7).

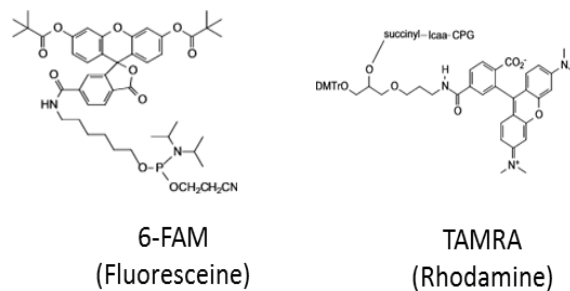


Figure II.7 : Phosphoramidites non nucléotidiques, Fluorescéine et Rhodamine.

La méthode des phosphoramidites a également permis de réaliser des modifications hydrophobes d'oligonucléotides notamment par du cholestérol à l'aide de phosphoramidites commerciaux ou fonctionnalisés en laboratoire, comme nous le verrons plus tard dans ce chapitre.

### 2.3. Etapes du cycle de synthèse

Le schéma (Figure II.8) suivant représente les différentes étapes du cycle de synthèse des oligonucléotides sur support solide.

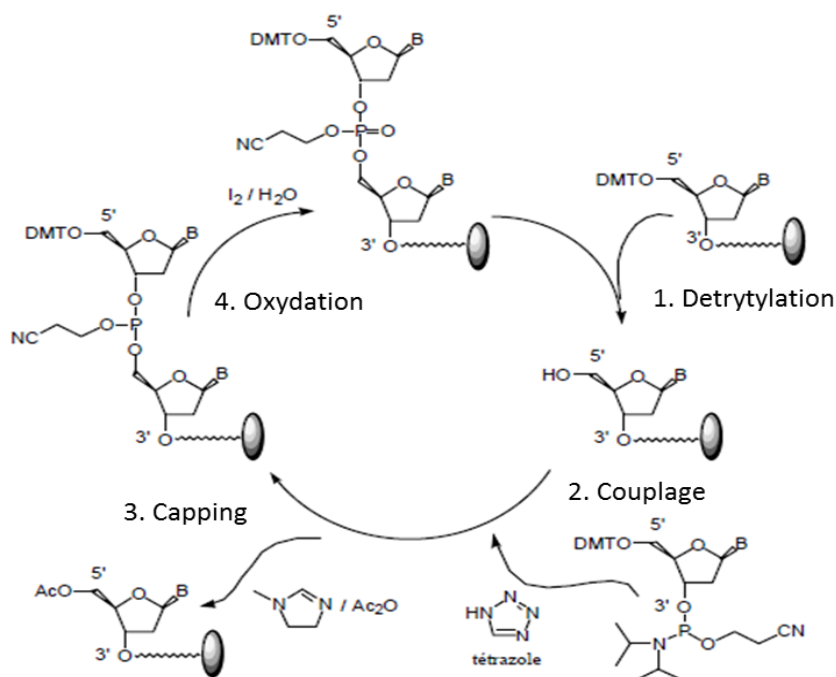


Figure II.8 : Synthèse d'oligonucléotide sur support solide par la méthode des phosphoramidites.

La première étape du cycle de synthèse est une détritylation qui consiste en la déprotection de la fonction 5'OH du nucléotide déjà présent sur le support. Le groupement protecteur diméthoxytrityl (DMT) est clivé au moyen d'acide trichloroacétique 3% en solution dans du dichlorométhane.

Cette déprotection est rapide et quantitative. D'autre part une couleur orange est produite après le clivage du DMT, dû à un carbocation, qui absorbe dans la région visible à 495 nm. L'intensité de cette absorbance permet de déterminer l'efficacité de couplage (Figure II.9).

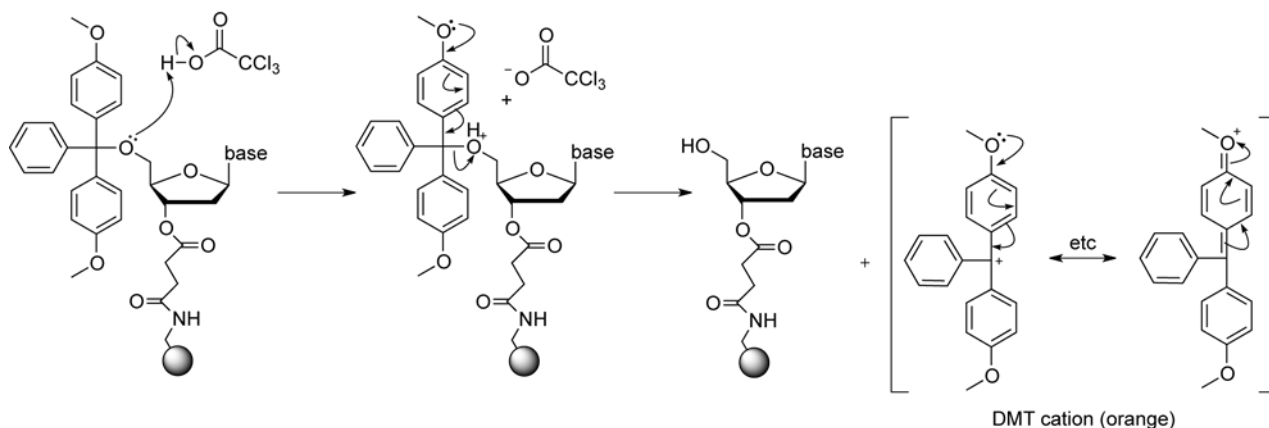


Figure II.9 : Etape 1, la détritulation

La seconde étape est le couplage entre le nucléotide présent sur la résine et le nucléotide suivant. La réaction de couplage est réalisée entre la fonction cyanoéthyl-diisopropylamine (CED) du phosphoramidite suivant et la fonction 5'-OH précédemment déprotégée et catalysée par le 5-benzylthio-tétrazole. Le groupe diisopropylamino du nucléoside phosphoramidite est protoné par le tétrazole faiblement acide, et est ainsi converti en un bon groupe partant. Il est rapidement déplacé par attaque nucléophile du groupe 5'-OH du nucléoside lié au support sur son atome de phosphore voisin, et une nouvelle liaison phosphore-oxygène est formée, créant une liaison phosphite triester (Figure II.10).

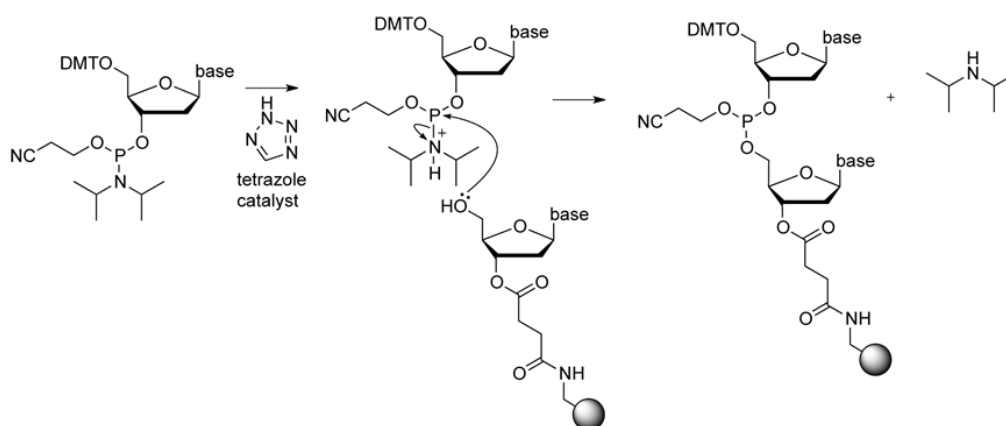


Figure II.10: Etape 2, le couplage.

La troisième étape porte le nom de capping ou terminaison. Le couplage à chaque étape de synthèse se fait avec de très bons rendements (98%), mais il

est impossible de parvenir à une réaction avec un rendement de 100% ce qui signifie qu'il y aura toujours quelques 5'-OH n'ayant pas réagi avec le phosphoramidite incorporé. Cette étape permet donc d'acétyler les hydroxyles libres n'ayant pas réagi et de les empêcher de réagir lors des cycles suivant de synthèse. On évite ainsi la formation d'oligonucléotides tronqués et mutés. Pour cela on fait agir de l'anhydride acétique en présence de pyridine et de N-méthylimidazole (Figure II.11).

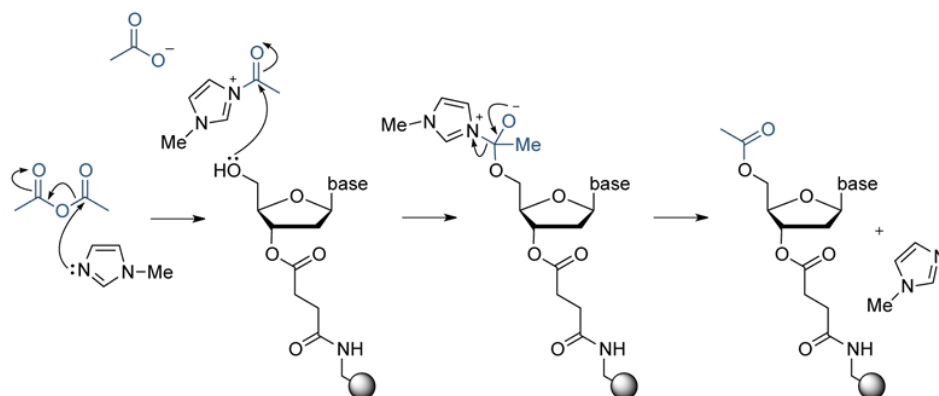


Figure II.11 : Etape 3, le capping.

La quatrième et dernière étape du cycle est une réaction d'oxydation par l'iode pour que le phosphore passe d'un degré d'oxydation III (PIII) à V (PV). Le phosphite-triester (P (III)) formé dans l'étape de couplage est instable en milieu acide et doit être oxydé avant la prochaine étape de détrituration. Cette oxydation est obtenue par l'action de l'iode en présence d'eau et de pyridine. La réaction d'oxydation est rapide et termine le cycle de synthèse (Figure II.12).

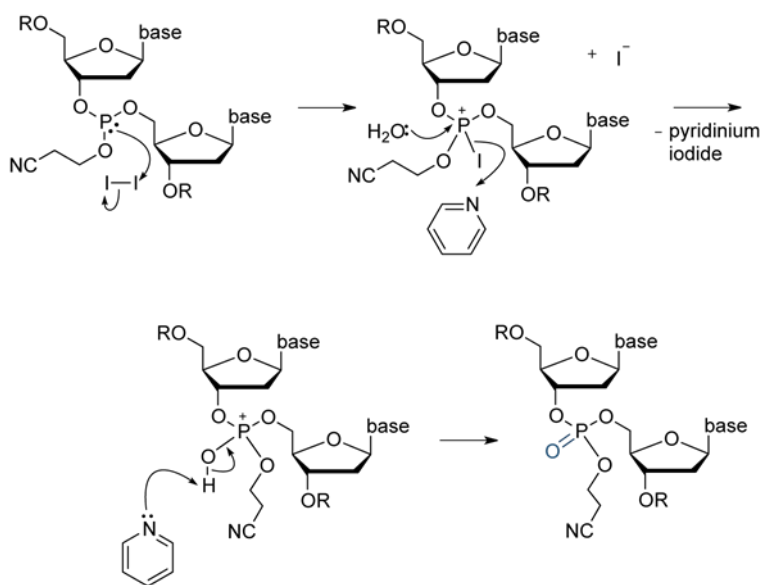


Figure II.12 : Etape 4, l'oxydation.

Suivant ces quatre étapes du cycle, les nucléotides sont successivement introduits pour former l'oligonucléotide désiré. A la fin de la synthèse, le DMT présent en 5' du dernier phosphoramidite incorporé peut être clivé ou non en fonction de la technique de purification envisagée.

### 3. Clivage du support et déprotection des oligonucléotides

Dans tous les cas, il est nécessaire de cliver les oligonucléotides du support solide et d'enlever les différents groupements protecteurs (Figure II.13):

- les groupements cyanoéthyles des phosphates
- les groupements benzoyles ou isobutyryles des bases nucléiques

Cette étape est réalisée par chauffage à 65°C dans une solution d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH). Cette solution de déprotection est ensuite éliminée par évaporation et l'oligonucléotide repris dans l'eau, est prêt pour la purification.

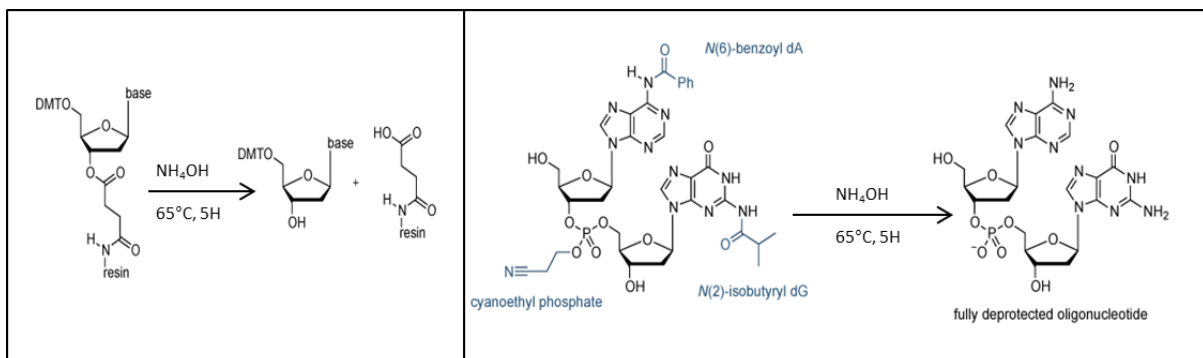


Figure II.13 : Clivage de l'oligonucléotide du support solide et déprotection des bases.

En fonction de la nature des bases utilisées, il peut y avoir d'autres étapes de déprotection à réaliser.

Par exemple pour les ARN, les hydroxyles en 2' sont protégés par un groupement terbutyldiméthylsilyle (TBDMS) (Figure II.14). La déprotection est réalisée par une solution de fluorure de tétrabutylamonium/triéthylamine (HF/TEA).

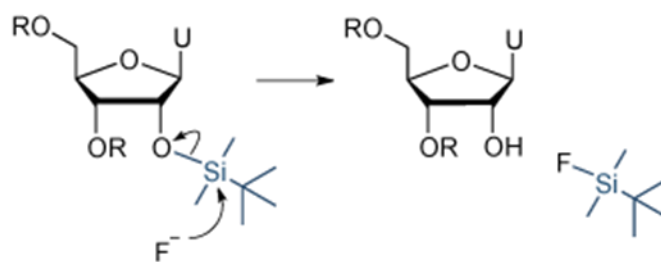


Figure II.14 : Déprotection de la position 2' des ARN.



Les oligonucléotides sont ensuite soumis à une précipitation au butanol pour éliminer la solution de déprotection et sont resuspendus dans l'eau.

#### **4. Purification des oligonucléotides**

Il existe différentes techniques pour la purification des oligonucléotides synthétiques :

- la chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec des colonnes d'affinités ou échangeuses d'ions. Elle permet une excellente séparation des produits (oligonucléotides tronqués) et convient pour les grandes échelles de synthèse en raison de la capacité et des propriétés de séparation des colonnes.

- L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en conditions natives ou dénaturantes (PAGE / SDS-PAGE). Elle permet une séparation en fonction des charges et de la longueur de l'oligonucléotide. Cette méthode procure un haut niveau de pureté mais avec un rendement plus faible lié notamment à l'extraction de l'oligonucléotide du gel.

- La purification en phase inverse sur cartouche. C'est une méthode de séparation, basée sur l'hydrophobie de l'oligonucléotide due à la présence du groupe 5'-DMT (DMT-ON), resté sur la dernière base incorporée lors de la synthèse automatisée. Il s'agit d'une technique rapide qui procure un niveau moyen de pureté, avec de bons rendements.

Le choix de la méthode utilisée dépend de la nature des molécules à purifier et aussi du degré de pureté souhaité.

Dans ce travail, Les oligonucléotides ont été essentiellement purifiés par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) sur des colonnes en phase inverse et plus rarement sur cartouches.

##### **4.1. HPLC (DMT-OFF)**

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une méthode efficace pour l'analyse et la purification d'oligonucléotides synthétiques simples ainsi que pour les ONA.

L'HPLC en phase inverse sépare les oligonucléotides sur la base des différences de caractère hydrophobe. Ainsi les oligonucléotides complets pourront être séparés des avortons de synthèse (formes tronquées) qui sont plus courts.

Les 2 solvants A et B utilisés pour cette purification HPLC contiennent un tampon TEA/acide acétique 0,1 M (pH 7) additionné de 5 % d'acétonitrile (A) ou de 80% d'acétonitrile (B).

Un gradient croissant en solvant B, donc en acétonitrile, permet la séparation des molécules, les plus hydrophobes étant éluées plus lentement. La détection des molécules est faite par UV à 260 nm, longueur d'onde d'absorbance caractéristique des oligonucléotides.

Les colonnes utilisées sont constituées de silice greffée par des chaînes aliphatiques de 18 carbones.

Les oligonucléotides ont été purifiés avec un gradient de 0 à 30% de solvant B en 35 minutes sur colonne C18. Ces molécules composées de 20 et 23 nucléotides de longueur, ont un temps de rétention moyen d'environ 17 minutes avec cette méthode (Figure II.15).

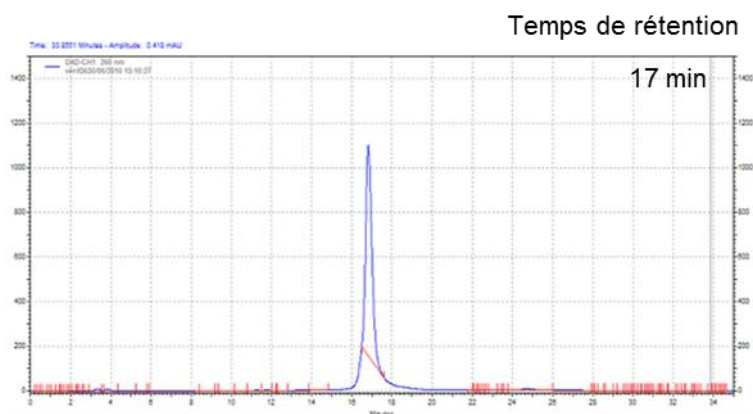


Figure II.15 : Profil HPLC d'un oligonucléotide ARN (22 nt) purifié sur colonne C18.

#### 4.2. Cartouches (DMT-ON)

Dans cette méthode de purification, la séparation des molécules est basée sur leur différence d'hydrophobie due à la présence du groupement protecteur DMT en 5' de la dernière base couplée, comme illustré dans la Figure II.16. Seuls les oligonucléotides complets possèdent ce 5'-DMT et sont retenus sur la colonne contrairement aux séquences tronquées qui seront éliminées par rinçage. Après une étape de détrylation sur la cartouche, le produit attendu est élué par une solution 20 mM de bicarbonate d'ammonium comportant 50% d'acétonitrile.

Pour cette méthode de purification, les oligonucléotides, à la fin de leur synthèse sur support, ne subissent pas la dernière étape qui consiste à enlever le dernier 5'-DMT.

Cette méthode est aussi efficace et plus rapide que la précédente mais le niveau de pureté est moindre. Pour un gain de temps, elle a été utilisée pour

purifier des oligonucléotides qui étaient destinés à subir une modification post-synthétique et donc à être repurifiés ultérieurement.

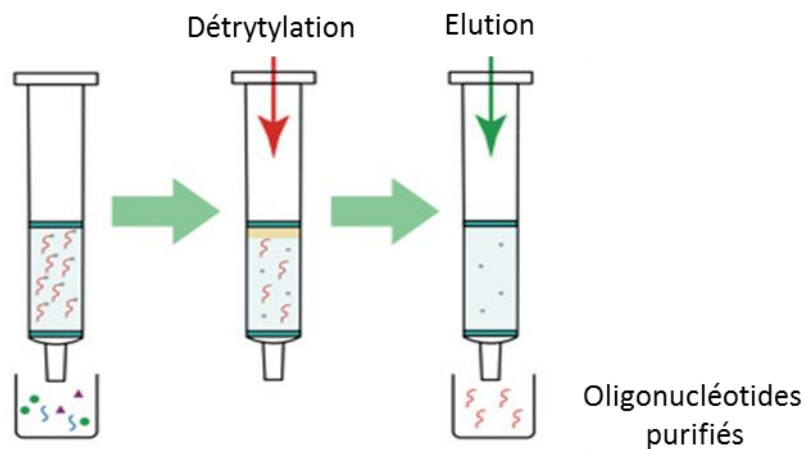


Figure II.16 : Purification DMT-ON sur cartouches.

Quelle que soit la méthode de purification choisie, les solutions contenant les oligonucléotides ont ensuite été évaporées à l'aide d'un SpeedVac pour éliminer les différents solvants utilisés puis repris dans de l'eau milli-Q autoclavée et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les concentrations ont été déterminées grâce à la mesure de l'absorbance par un Nanodrop et aux valeurs de coefficient d'extinction molaire qui ont été calculées par le logiciel suivant :

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.

### III. Bioconjugaison

#### 1. Molécules hydrophobes utilisées pour la bioconjugaison

Les molécules hydrophobes utilisées pour la synthèse des ONA sont essentiellement lipidiques.

La première molécule lipidique qui a été utilisée est le cholestérol (Figure II.17).

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus physiologique et biochimiques.

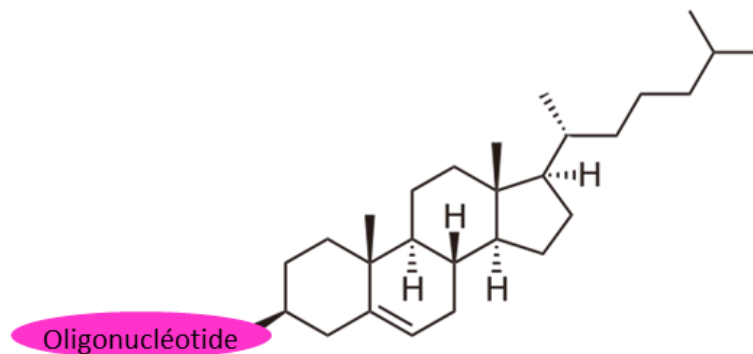


Figure II.17 : Oligonucléotide conjugué au cholestérol.

À ce jour, plusieurs exemples dans la littérature ont démontré l'efficacité des bioconjugués cholestérol pour la pénétration cellulaire. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, cette internalisation est notamment possible grâce à l'ancrage du cholestérol dans les membranes cellulaires hydrophobes et le déclenchement des mécanismes d'endocytose. Elle peut également se faire grâce à des récepteurs de lipoprotéines. Dans le cadre de la modification des oligonucléotides, le cholestérol a notamment été employé avec succès pour la conception des antagoniR [135,136].

Par la suite nous avons utilisé une autre famille de molécules lipidiques que sont les chaînes carbonées saturées, que l'on retrouve notamment dans les acides gras (Figure II.18). Plusieurs chaînes carbonées ont été utilisées. Des chaînes lauriques (12 carbones), myristiques (14 carbones), stéariques (18 carbones) et de type palmitique (double chaîne de 15 carbones).

La longueur de la chaîne carbonée a un impact sur l'hydrophobie et par conséquent sur le caractère amphiphile des bioconjugués résultants. L'utilisation de ces différentes chaînes a été faite en fonction de l'application envisagée.

En effet, il existe un compromis à faire à ce niveau pour obtenir une hydrophobie optimale.

Dans un contexte d'ancrage des oligonucléotides à la surface d'une nanoparticule par exemple, l'hydrophobie doit être assez importante pour permettre la stabilité et l'efficacité du système.

Dans un contexte de délivrance cellulaire, l'hydrophobie doit être assez importante pour permettre une bonne internalisation, mais sans entraîner un ancrage trop important au niveau des membranes, ce qui empêcherait les oligonucléotides d'atteindre leur cible dans la cellule.

Les capacités d'internalisation et d'ancrage de ces différentes molécules ont été étudiées dans les chapitres suivants.



Figure II.18 : Oligonucléotide conjugué avec différentes chaînes carbonées saturées (C12, C14, C18, diC15).

Une dernière chaîne a également été utilisée et se distingue des précédentes par la substitution des hydrogènes par des atomes de fluor. Il s'agit d'une chaîne perfluorocarbonée (Figure II.19). Ces molécules présentent la particularité d'être hydrophobes mais en même temps lipophobes ce qui constitue un intérêt pour l'internalisation des ONA. En effet, l'hydrophobie permettrait aux oligonucléotides de traverser les membranes et la lipophobie devrait induire leur relargage des membranes phospholipidiques. Ces ONA auraient ainsi moins de probabilité de rester piégés au niveau des membranes cellulaires.

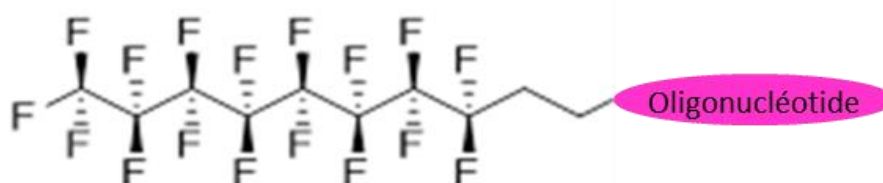


Figure II.19 : Oligonucléotide conjugué avec une chaîne perfluorocarbonée.

## 2. Stratégies adoptées pour la bioconjugaison

Dans ce travail de thèse, l'utilisation de phosphoramidites fonctionnalisés et de la chimie clic et plus particulièrement la cyclo-addition 1,3-dipolaire a permis d'introduire la modification hydrophobe des oligonucléotides selon les stratégies pré-synthétique et post-synthétique explicitées dans le chapitre I.

### 2.1. Stratégie pré-synthétique

Comme nous l'avons vu précédemment, le phosphoramidite est l'unité

de base utilisé pour la synthèse sur support solide des oligonucléotides. De ce fait, la stratégie la plus employée est l'introduction du bioconjugué *via* un phosphoramidite au cours de la synthèse automatisée.

Cela nécessite au préalable la synthèse d'un phosphoramidite correctement fonctionnalisé. La condition *sine que non* est que ce dernier soit suffisamment stable pour supporter les protocoles mis en œuvre au cours de la synthèse (conditions acides et d'oxydation) et de la déprotection des oligonucléotides (conditions alcalines).

Les phosphoramidites permettent en théorie l'incorporation de la modification hydrophobe n'importe où dans la séquence de l'oligonucléotide : en position terminale sur les extrémités 3' et 5', ainsi qu'à l'intérieur de la séquence. Cependant, l'incorporation de phosphoramidites modifiés par des lipides, en début ou en milieu de séquence est moins utilisée car moins efficace. Les rendements sont inférieurs à ceux d'une incorporation à l'extrémité 5' certainement du à un encombrement stérique trop important. Pour la position 3' et en milieu de séquence, il vaut mieux adopter une stratégie post-synthétique.

### 2.1.1. Phosphoramidites commerciaux

Cependant quelques supports et phosphoramidites fonctionnalisés par du cholestérol sont commerciaux (Link Technologies) permettant d'introduire facilement cette modification hydrophobe aux extrémités 3' et 5', comme le montre la (Figure II.20).

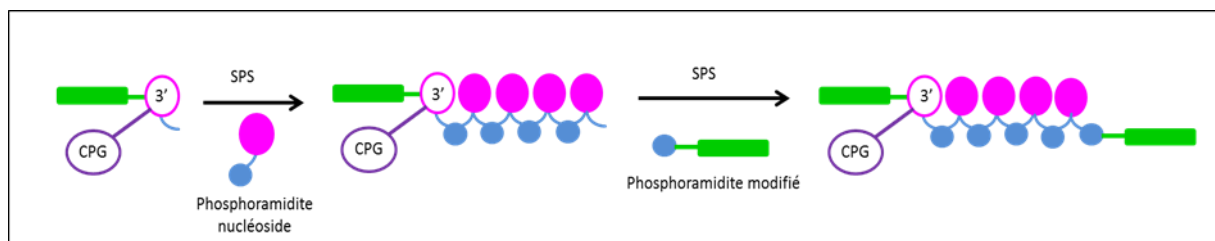


Figure II.20 : Modification par les phosphoramidites commerciaux.

Les premiers ONA synthétisés dans ce travail sont issus de ces synthons commerciaux porteurs d'un reste cholestérol espacé de l'oligonucléotide (espaceur de 12 atomes de carbone). Ils ont été introduits aux extrémités 3' et/ ou 5'. Parmi ces bioconjugués, trois possèdent un pont disulfure (en 3', en 5' et en 3' et 5') susceptible d'être coupé au moment opportun dans des conditions réductrices afin de libérer l'oligonucléotide de sa modification hydrophobe. Au total, une petite famille de 6 molécules a été préparée (Figure II.21).

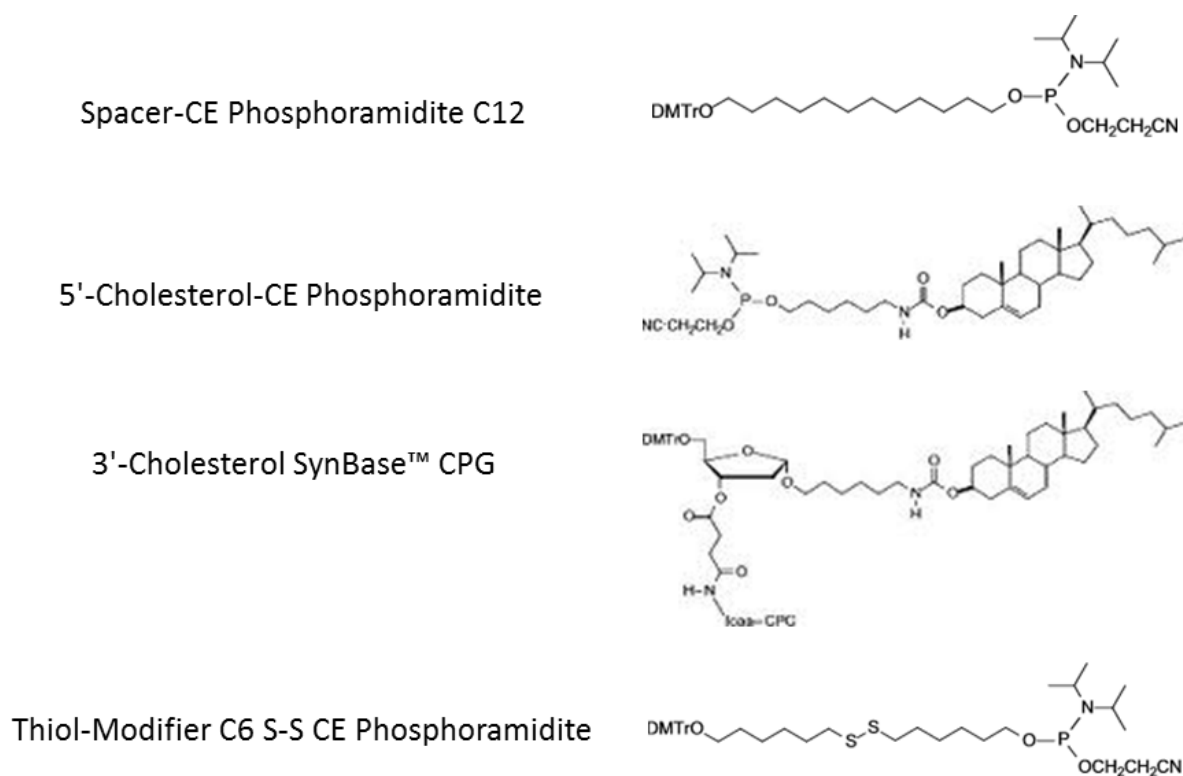


Figure II.21 : Exemple de phosphoramidites et de support modifiés commerciaux.

### 2.1.2. Phosphoramidites fonctionnalisés

Des phosphoramidites fonctionnalisés porteurs de lipides autres que du cholestérol et destinés à être introduits à l'extrémité 5' des oligonucléotides ont été préparés puis couplés à l'oligonucléotide comme le montre la Figure II.22.

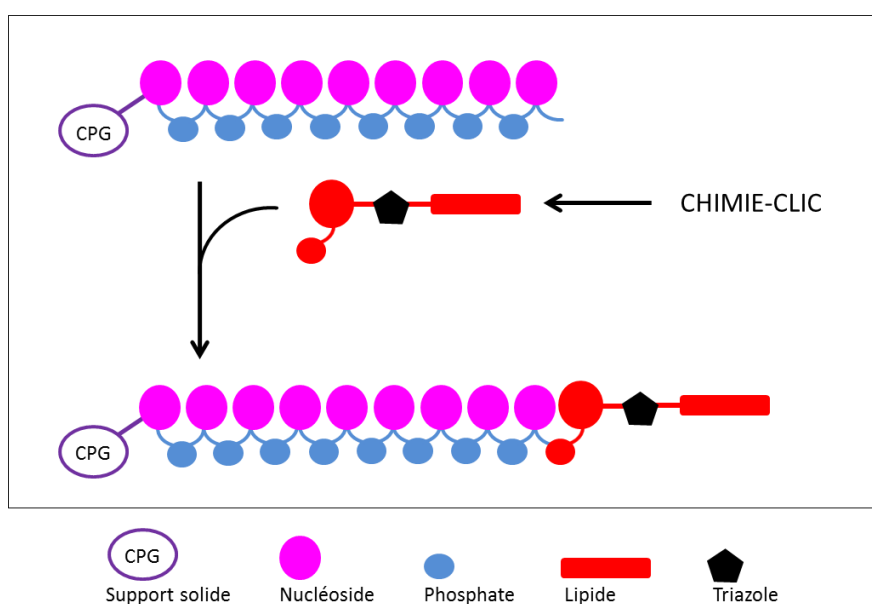


Figure II.22 : Modification en 5' des oligonucléotides par couplage de phosphoramidites modifiés.

Pour cela la chimie clic a été principalement utilisée. La stratégie a consisté à synthétiser des nucléosides conjugués à différents lipides par cyclo-addition 1,3-dipolaire puis à les transformer en phosphoramidites afin de les introduire à la fin de la synthèse automatisée de l'oligonucléotide (Figure II.23).

Cependant, parmi ces phosphoramidites fonctionnalisés l'un d'eux a été exceptionnellement obtenu non pas par cyclo-addition 1,3-dipolaire mais par une réaction de cétylisation.

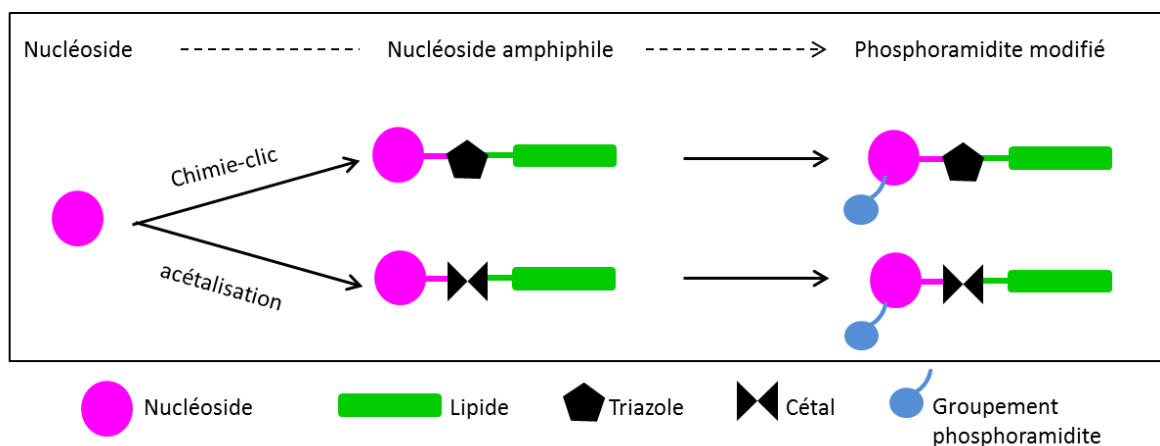


Figure II.23 : Schéma récapitulatif de synthèse des phosphoramidites fonctionnalisés

### 2.1.2.1. Couplage du lipide par réaction de cétylisation

La réaction de cétylisation sur le nucléoside a permis d'introduire deux chaînes aliphatiques de 15 carbones, au niveau du sucre, donc sur les positions 2' et 3'.

Cette réaction de cétylisation est couramment utilisée dans la chimie des sucres notamment pour protéger les fonctions alcools. Elle a été obtenue dans notre cas par réaction entre la palmitone et l'uridine dans du THF et par catalyse acide [141].

Ainsi les deux chaînes aliphatiques de 15 carbones ont été fixées sur les positions 2' et 3' du sucre par l'intermédiaire d'une fonction cétyle **1**. Etant donné que ces deux positions sont engagées dans le couplage avec les chaînes hydrophobes, le résidu phosphoramidite a lui, été préparé en position 5' par le 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite pour donner le composé **2** (Figure II.24).



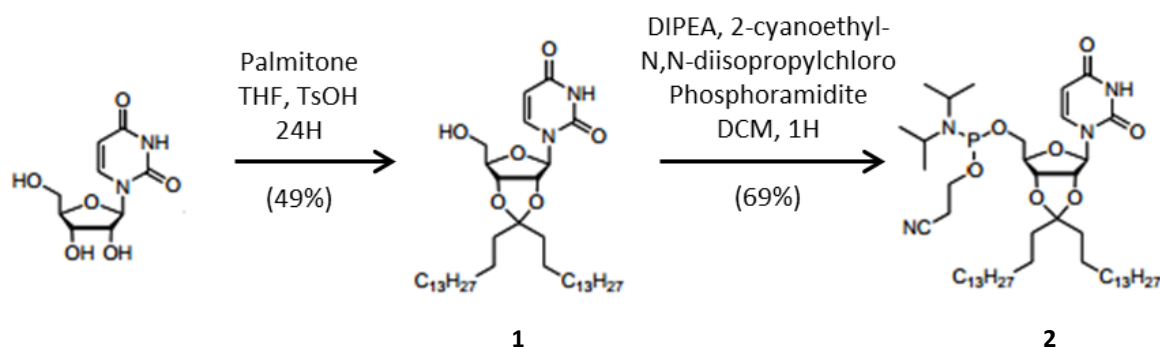


Figure II.24 : Schéma de synthèse du phosphoramidite **2**.

Le phosphoramidite ainsi synthétisé ne permet la bioconjugaison de l'oligonucléotide qu'à l'extrémité 5'.

### 2.1.2.2. Couplage du lipide par chimie clic

Trois molécules hydrophobes : un résidu cholestérol, une chaîne aliphatique de 18 carbones et deux chaînes aliphatiques de 15 carbones ont été couplées à une thymidine par la cyclo-addition 1,3- dipolaire. Pour cela, la fonction azide a été introduite sur le nucléoside en position 5' et les fonctions alcynes sur les molécules hydrophobes [142].

Le dérivé 5'-azido-5'-désoxy -thymidine **3** [143] a ainsi été synthétisé selon un protocole bien décrit dans la littérature par formation d'un mésylate puis substitution nucléophile par l'azoture de sodium (Figure II.25).

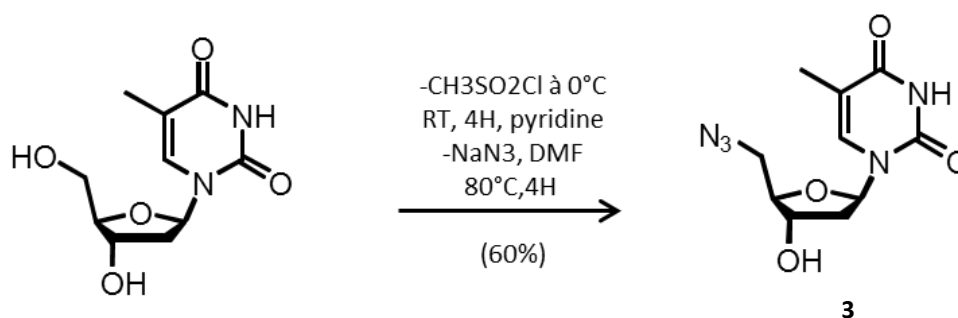


Figure II.25 : Schéma de synthèse du 5'-azido-5'-désoxy -thymine **3**.

Les molécules hydrophobes dérivées du cholestérol et de la chaîne en C18, quant à elles, ont été synthétisées par réaction de Williamson à partir des précurseurs commerciaux portant une fonction alcool avec le bromure propargylique pour la molécule **4** (Figure II.26) et avec le bromure d'octadécyle pour la molécule **5** (Figure II.27).

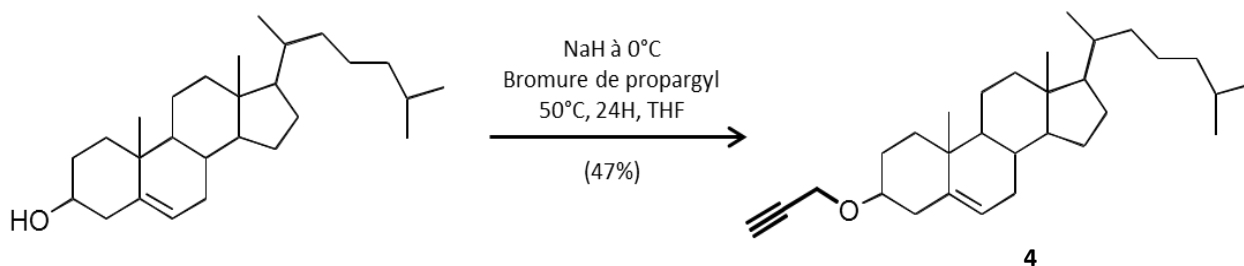


Figure II.26 : Schéma de synthèse du cholestérylpropargyléther (Chol) **4**.

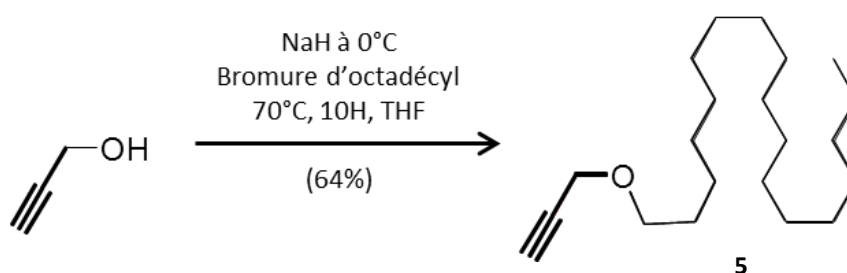


Figure II.27 : Schéma de synthèse de l'octadécylpropargyléther (C18) **5**.

Dans le cas particulier des deux chaînes aliphatiques de 15 carbones, c'est l'uridine amphiphile précédemment décrite qui a été utilisée. La position 5' a été engagée dans une réaction de Williamson avec le bromure propargylique conduisant à l'alcyne correspondant **6** (Figure II.28).

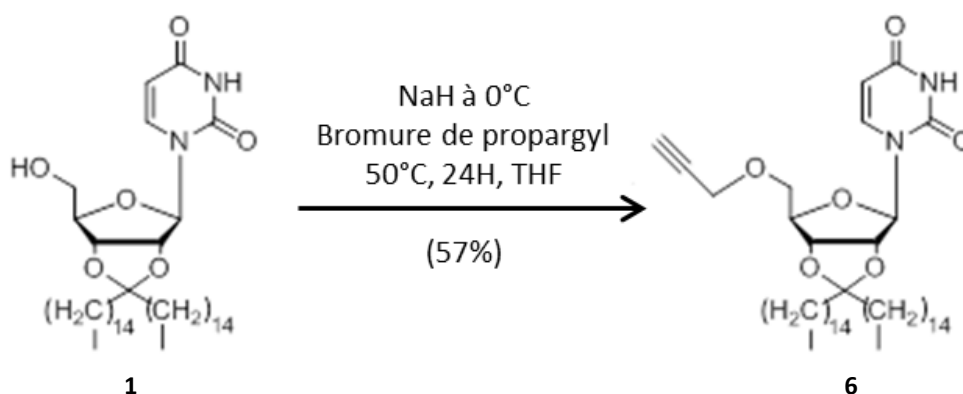
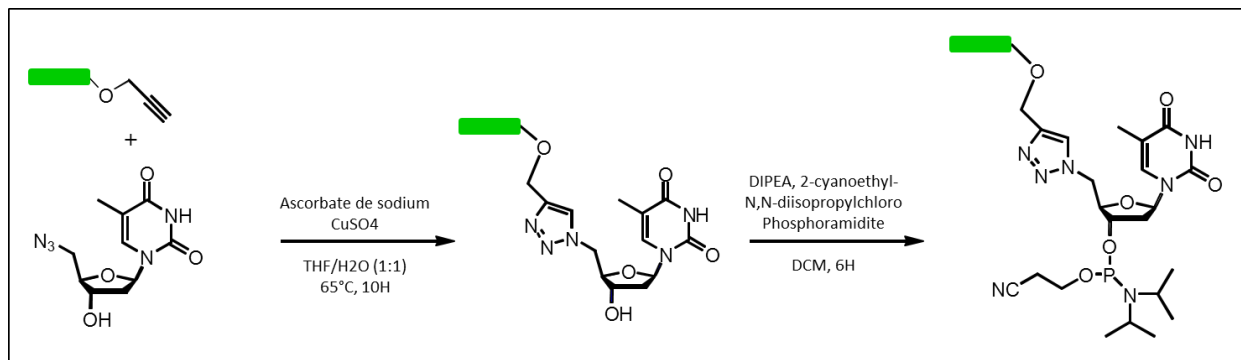


Figure II.28 : Schéma de synthèse de l'alcyne **6** (UdiC15).

La cyclo-addition 1,3-dipolaire a ensuite été faite en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium dans un mélange eau/THF, à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 10 H pour obtenir le nucléoside amphiphile. La dernière étape dans la synthèse du phosphoramidite est la modification de la position 3' par le 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite qui assurera le couplage avec l'oligonucléotide dans la synthèse automatisée sur support (Figure II.29).



	= Chol	<b>7</b>	87%	<b>10</b>	65%
	= C18	<b>8</b>	58%	<b>11</b>	49%
	= U diC15	<b>9</b>	79%	<b>12</b>	65%

Figure II.29 : Schéma et rendements de synthèse des phosphoramidites **7-12**.

Par cette approche de pré-synthèse qui consiste à fonctionnaliser les phosphoramidites avant de les introduire dans la synthèse automatisée des oligonucléotides un certain nombre de modifications résumées dans la figure ci-dessous ont été faites. Notons que les parties hydrophobes ont été placées aux extrémités 3' et 5' dans le cas des supports et phosphoramidites commerciaux et à l'extrémité 5' uniquement dans le cas des phosphoramidites fonctionnalisés au laboratoire (Figure II.30).

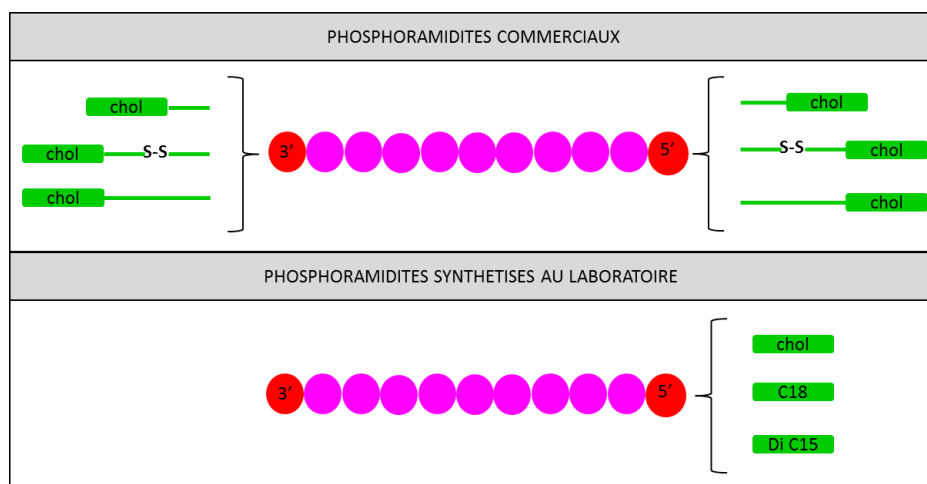


Figure II.30 : Récapitulatif des modifications hydrophobes par la stratégie pré-synthétique.

## 2.2. Stratégie post-synthétique

Par la suite, nous avons mis en place une deuxième stratégie dans laquelle la chimie clic a été utilisée pour le couplage direct des lipides sur les

oligonucléotides après leur synthèse complète. Pour ce faire les fonctions réactives mises en jeu dans la cyclo-addition 1,3-dipolaire ont été préalablement introduites sur les oligonucléotides et les lipides (Figure II.31).

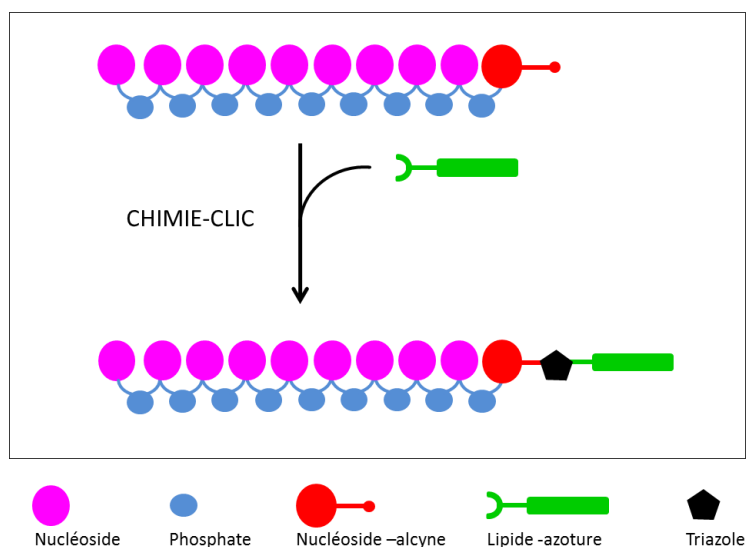


Figure II.31 : La stratégie post-synthétique.

La fonction alcyne a été fixée sur l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un phosphoramidite particulier *via* une chaîne de type octadiyne (Figure II.32), tandis que la fonction azoture a, elle, été substituée sur le lipide.

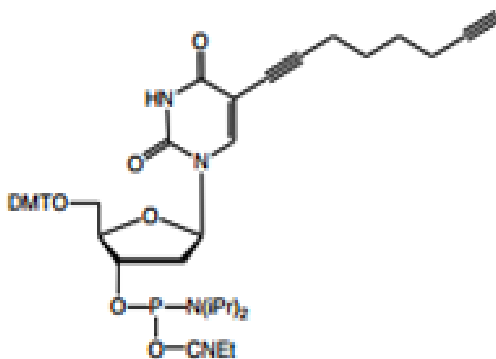


Figure II.32 : Phosphoramidite portant une fonction alcyne.

Cette deuxième stratégie de bioconjugaison présente l'avantage de permettre l'introduction d'une grande variété de lipides sur toutes les positions de l'oligonucléotide. Il suffit d'intégrer le phosphoramidite octadiyne à n'importe quel moment de la synthèse [144,145]. L'ajout de plusieurs phosphoramidites peut également être envisagé afin de modifier les ratios lipides/oligonucléotides.

Par cette stratégie nous avons modifié les oligonucléotides avec des chaînes aliphatiques de différentes longueurs (C12, C14, C18, une double chaîne C15), du cholestérol et enfin une chaîne perfluorocarbonée. Le

schéma suivant est un récapitulatif des modifications hydrophobes réalisées par cette seconde stratégie post-synthétique (Figure II.33).

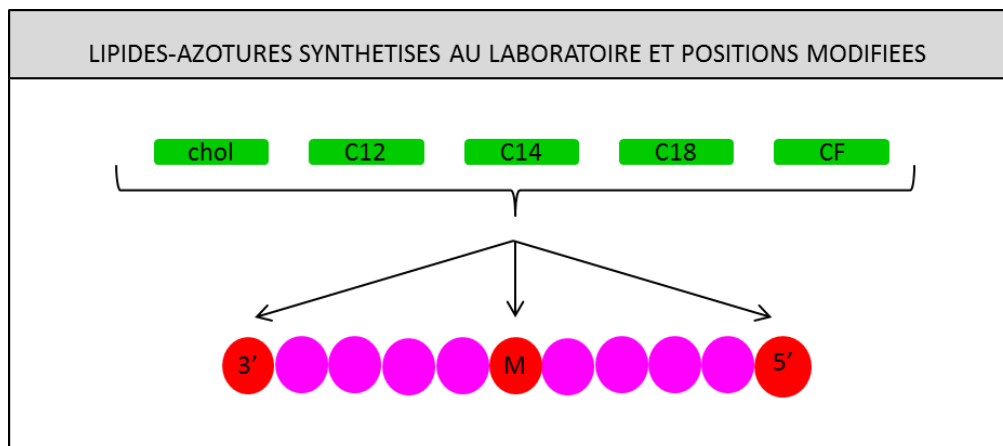


Figure II.33 : Récapitulatif des modifications hydrophobes par la stratégie post-synthétique.

### 2.2.1. Synthèse des lipides-azides

De façon générale, la synthèse de lipides-azides a été réalisée par substitution nucléophile des dérivés bromés correspondants par l'azoture de sodium dans le DMF avec de très bons rendements. Les schémas de synthèses de ces molécules sont présentés dans les figures suivantes. (Figure II.34, Figure II.35, Figure II.36, Figure II.37).

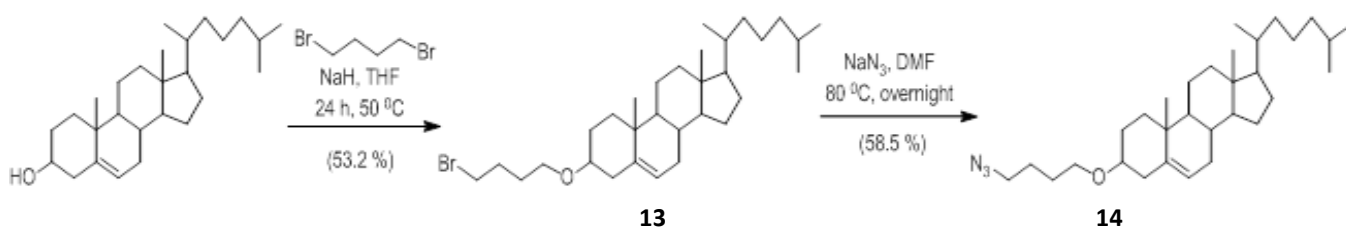


Figure II.34 : Synthèse de l'azido-cholestérol **14**.

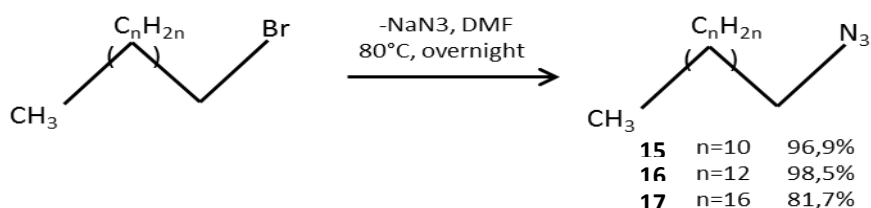


Figure II.35 : Schéma de synthèse des azido-décane **15**, azido-tétradécane **16** et azido-octadécane **17**.

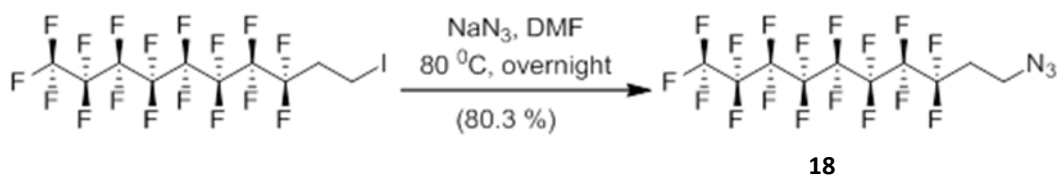


Figure II.36 : Schéma de synthèse de l'heptadecafluoro-10-azidodecane **18**.

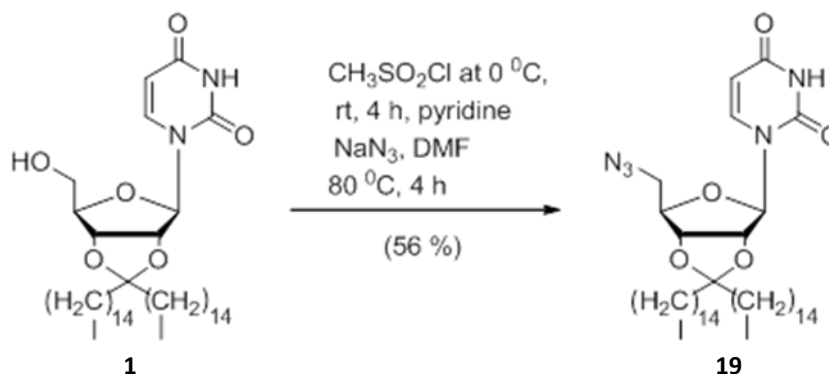


Figure II.37 : Schéma de synthèse de l'azido cétal-diC15 **19**.

### 2.2.2. Optimisation de la cyclo-addition 1,3-dipolaire

Dans cette réaction de CuAAC entre un oligonucléotide-alcyne et un lipide-azide le cuivre I a été généré de deux façons:

- i) par l'ajout direct de Cu(I) *via* le bromure de cuivre (CuBr) et du ligand TBTA dans un mélange de solvants terbutanol/diméthylsulfoxyde
- ii) par l'ajout de Cu(II) *via* le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) réduit *in situ* par l'ascorbate de sodium dans un mélange de solvants eau/ EtOH/THF, avec et sans ligand TBTA.

Les conditions réactionnelles ont été optimisées en se basant sur ces deux systèmes de catalyse et en variant différents paramètres :

- les quantités d'équivalents de réactifs et catalyseurs
- le temps de réaction
- la température
- l'utilisation de micro-ondes
- l'utilisation d'oligonucléotides « supportés » ou en solution.

Lorsque la réaction a été faite sur les oligonucléotides-alcynes en solution, la déprotection des bases et le clivage de la résine ont été

préalablement réalisés dans les conditions décrites précédemment pour les oligonucléotides simples.

Le premier protocole a été inspiré par Gramlich et al. en 2008 [144] et correspond à la réaction R1 dans le Tableau II.1 Il a été fait sur les oligonucléotides-alcynes en solution et le système catalyseur-solvant utilisé a été le bromure de cuivre avec du TBTA dans le mélange terbutanol/diméthylsulfoxyde, avec des nombres d'équivalents de 15, 22.5 et 45 pour le lipide, le cuivre et le ligand respectivement. L'obtention du produit attendu a pu être confirmée par analyse HPLC et spectrométrie de masse mais avec un rendement extrêmement faible, environ 5 %.

Dans la deuxième réaction R2, les équivalents ont été multipliés par 2, la température augmentée de 25°C à 60°C et le temps de réaction prolongé de 4h à 24h. Ainsi le nouveau rendement de la réaction a été multiplié par quatre et a atteint alors 20%. Pour trouver le temps optimal, cette réaction a été suivie par HPLC pendant 72 h avec prélèvements d'aliquots à 12, 24, 36 et 72h. Cette analyse nous a montré que le pic majoritaire (tr = 20 min) apparaît dès 24 h. Ce pic correspond bien au produit de la réaction (ON bioconjugué amphiphile).

Malgré cette amélioration la quantité de produit obtenue étant encore insuffisante, nous nous sommes inspirés du travail de Yamada et al. en 2011 [145]. Nous avons modifié le système catalytique et opté pour le cuivre I généré in situ par l'ascorbate de sodium dans un mélange méthanol/eau/tetrahydrofurane toujours avec l'oligonucléotide-alcyne en solution. De plus pour une meilleure activation de la réaction, le mélange réactionnel a été soumis à des irradiations micro-ondes avec une puissance de 100 W. Il s'agit des réactions notées RMW dans le tableau ci-après.

Pour la réaction RMW1, les quantités d'équivalents utilisées ont été de 30 pour le lipide, le TBTA et l'ascorbate et de 4 équivalents pour le sulfate de cuivre.

Le temps optimal de la réaction a été déterminé par un suivi HPLC à 15, 30, 45 et 60 min d'irradiation. Le pic majoritaire correspondant au produit de la réaction est apparu après 45 min. Ce protocole a permis d'augmenter le rendement à 30 %, mais l'observation du chromatogramme HPLC en mode 3D révèle la présence d'un pic à 230 nm correspondant à un produit co-élué. Nous avons émis l'hypothèse que ce pic pouvait être lié à la présence de TBTA.

La réaction RMW2 a donc été réalisée dans les mêmes conditions mais sans ligand sur des oligonucléotides en solution ou sur le support. Le produit attendu a été obtenu avec un rendement de l'ordre 60 %. C'est ce protocole qui a été sélectionné pour la suite de l'étude.

Réaliser la réaction de cyclo-addition avec les oligonucléotides encore sur le support, a permis un gain de temps en évitant les purifications intermédiaires. D'autre part, de nombreux lavages avec des agents chélatants du cuivre (EDTA) peuvent être faits pour éliminer au maximum le cuivre de la réaction.

Avec les oligonucléotides en solution, un dernier protocole RMW3 a été réalisé dans les mêmes conditions, mais avec des quantités d'équivalents moins importantes, ce qui a permis de limiter les quantités de cuivre utilisées.

Nom de la réaction	Nombre d'équivalents						solvants	Temps	Température °C	Puissance W	Rendements %
	Oligo-alcyne	Lipide-azide	CuBr	TBTA	CuSo4	Ascorbate de sodium					
R1 solution	1	15	22,5	45	-	-	DMSO/tBuOH 3:1	4H	25		5
R2 solution	1	30	45	90			DMSO/tBuOH 3:1	24H	60		20
RMW1 solution	1	30		30	4	30	MeOH/H2O/THF 2:2:1	45 min	60	100	30
RMW2 solution support	1	30			4	30	MeOH/H2O/THF	45 min	60	100	60
RMW3 solution	1	7,5			0,63	7,5	MeOH/H2O/THF	45 min	60	100	60

Tableau II.1: Conditions réactionnelles utilisées pour la bioconjugaison des lipides-azides sur les oligonucléotides-alcynes.

### 3. Purification des ONA

La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse, permet la séparation des molécules sur la base des différences de caractère hydrophobe. Ainsi les oligonucléotides non modifiés ont pu être facilement séparés de ceux qui possèdent une ou plusieurs chaînes hydrophobes.

La présence de ces chaînes augmente considérablement l'interaction avec la colonne, justifiant l'utilisation d'une colonne à silice greffée par des chaînes carbonées de 4 carbones (C4) et non plus de 18 carbones comme pour les oligonucléotides simples.

La purification a été possible par l'application d'un gradient de 0 à 80% ou 100% de solvant B en 35 minutes sur colonne C4. Les temps de rétention étaient compris entre 12 et 25 minutes (Figure II.38), comparé à



environ 10 minutes pour l'oligonucléotide non modifié analysé dans les mêmes conditions expérimentales. Ces variations dépendaient de la nature (Figure II.39) et du nombre (Figure II.40) de modifications hydrophobes incorporées sur l'oligonucléotide comme le montrent les profils HPLC suivants.

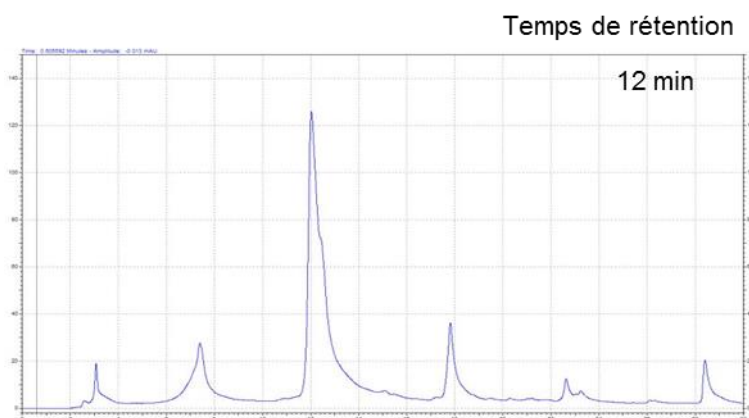


Figure II.38: Profil HPLC d'un oligonucléotide amphiphile modifié avec le résidu C14.

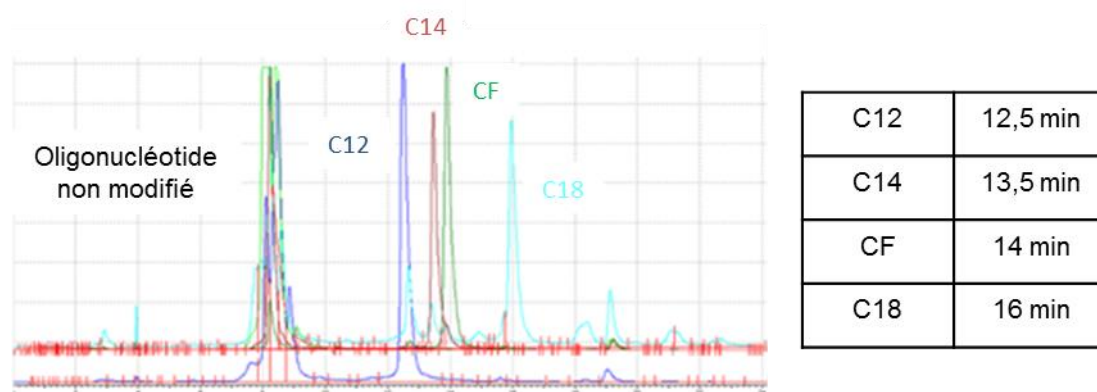


Figure II.39: Profils HPLC, comparaison des temps de rétention en fonction de la nature de la modification.

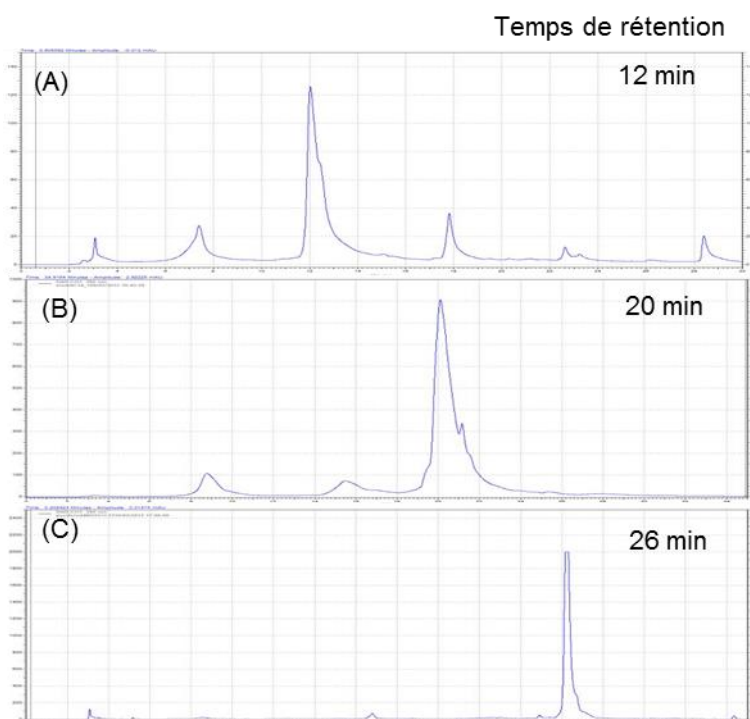


Figure II.40 : Profils HPLC, comparaison des temps de rétention en fonction du nombre de modification. (A) un résidu C14, (B) deux résidus C14, (C) trois résidus C14.

Ce chapitre a permis de présenter les différentes stratégies de synthèse qui ont été exploitées dans cette thèse pour la préparation d'ONA ciblant les miARN et destinés à être utilisés comme inhibiteurs de miARN ou comme analogues de miARN.

La bioconjugaison a été faite par l'intégration de phosphoramidites fonctionnalisés en fin de synthèse selon une stratégie de pré-synthétique ou par réaction de cyclo-addition 1,3-dipolaire entre des oligonucléotides-alcyne et des lipides-azides selon une stratégie de post-synthétique.



PARTIE III :  
PLATEFORME QD A VISEE  
DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE

---

## I. Présentation générale de la nanoplateforme QD-ONA

L'objectif de cette partie est de développer une nanoplateforme de détection et d'imagerie des miARN qui soit rapide, sensible et qui permette des études sur cellules vivantes. A l'heure actuelle, la méthode de détection des miARN la plus largement utilisée est l'hybridation *in situ* [146]. Cependant cette méthode est longue, peu sensible et ne permet pas une détection en temps réel des miARN.

A l'heure actuelle, pour répondre à ces exigences, de nouveaux systèmes de détection basés sur des techniques de fluorescence notamment sont en train d'émerger. Celles-ci sont plus sensibles et permettent de réaliser des expériences en temps réel [147-149].

Nous avons envisagé le développement d'une nanoplateforme basée sur les Quantum Dots (QDs), nanocristaux aux propriétés de fluorescence remarquables par rapport aux fluorophores organiques classiques [150].

La nanoplateforme possède en son cœur des nanocristaux de QDs et en surface des oligonucléotides anti-miARN pour la détection et l'imagerie du miARN d'intérêt (Figure III.1). Le miARN modèle utilisé ici, est miR-21, largement surexprimé dans de nombreux types de cancer (Cf chapitre I).

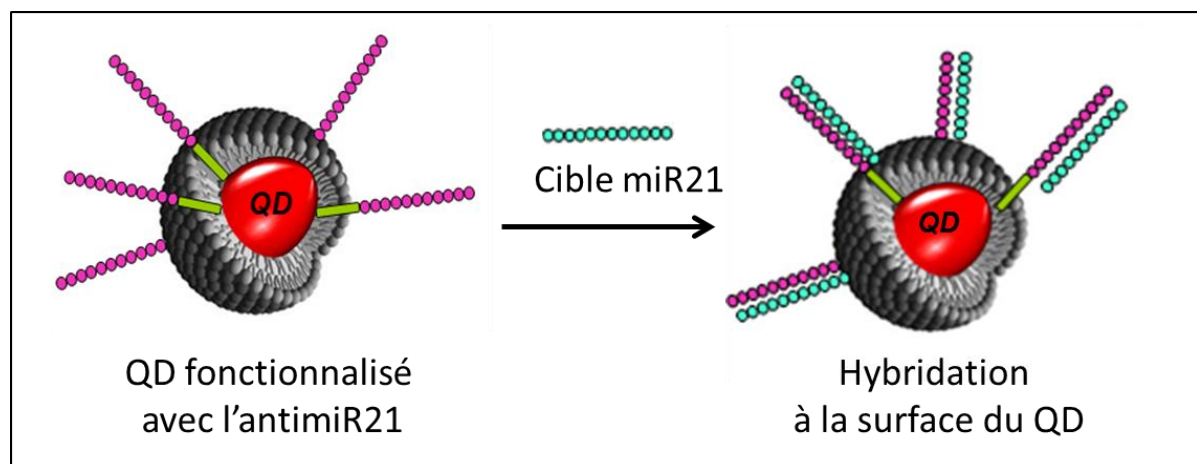


Figure III.1 : Présentation générale de la nanoplateforme à base de QD.

## II. Les QDs

### 1. Structure chimique des QDs

Les QDs sont des particules de tailles nanométriques, constitués de nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. Le diamètre peut varier entre 1 et 10 nm, ce qui correspond à quelques centaines voire dizaines de milliers d'atomes. La taille des QDs est comparable à celle des protéines couramment utilisées en biologie, comme la Green Fluorescent Protein (GFP), la streptavidine et les anticorps, mais est au moins dix fois plus grosse que la plupart des fluorophores organiques, comme par exemple la cyanine 3 (Figure III.2).

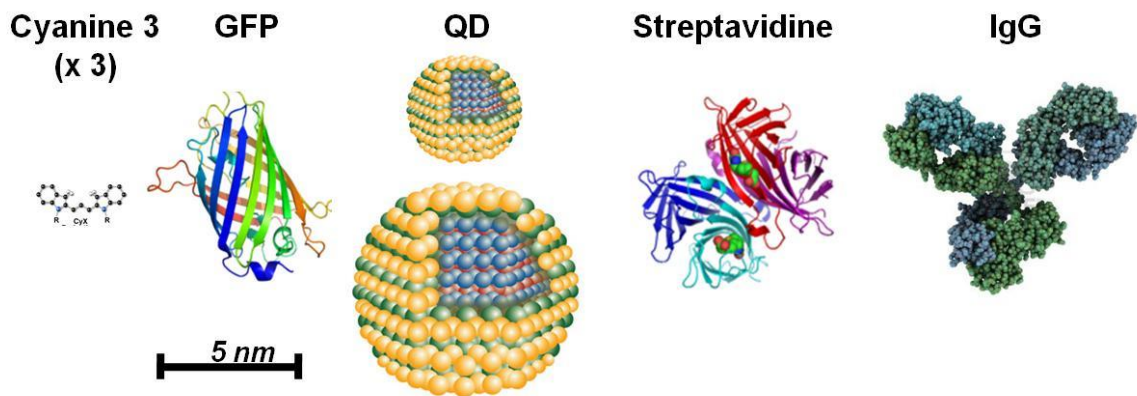


Figure III.2 : Taille respective des QDs.

Les QDs possèdent une structure dite en cœur/coquille comme le montre la Figure III.3. Le plus souvent le cœur est composé d'atomes de Cadmium (Cd) et de Sélénium (Se) qui émettent dans le visible. Ce cœur est recouvert d'une coquille, composée généralement de Zinc (Zn) et de Soufre (S). Elle est destinée à protéger le cœur et permet d'obtenir de meilleurs rendements quantiques. En effet la surface des nanocristaux peut contenir des imperfections et des défauts qui constituent des pièges à électrons, diminuant les performances optiques des QDs. Quand le cœur du QD n'est pas passivé, la désexcitation *via* des chemins non radiatifs peut remplacer la recombinaison radiative et, par conséquent, le rendement quantique de fluorescence diminue considérablement. C'est pour éliminer ces défauts qu'une coquille inorganique d'un autre semi-conducteur est placée autour du cœur.

Les QDs inorganiques sont généralement revêtus d'une couche hydrophobe constituée de trioctylphosphine (TOP) ou d'oxyde de trioctylphosphine (TOPO), ligands issus des solvants organiques utilisés lors de la synthèse. Ces ligands permettent de stabiliser les particules et d'empêcher leur agrégation mais les rend insolubles dans l'eau.

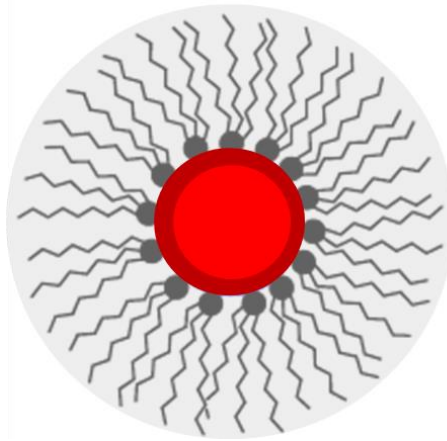


Figure III.3 : Représentation schématique d'un QD cœur/coquille, entouré de ligands hydrophobes.

## 2. Propriétés électroniques et optiques des QDs

### 2.1. Propriétés électroniques

Dans un cristal, les électrons se répartissent par bandes et la conduction électrique résulte du déplacement des électrons entre ces bandes. Il existe trois grands types de matériaux : les isolants, les semi-conducteurs et les conducteurs. Ils contiennent tous une bande basse en énergie appelée bande de valence et une bande haute en énergie appelée bande de conduction. Ils se différencient par la distance qui sépare la bande de valence de la bande de conduction et qui s'appelle la bande interdite ou « band gap » (Figure III.4).

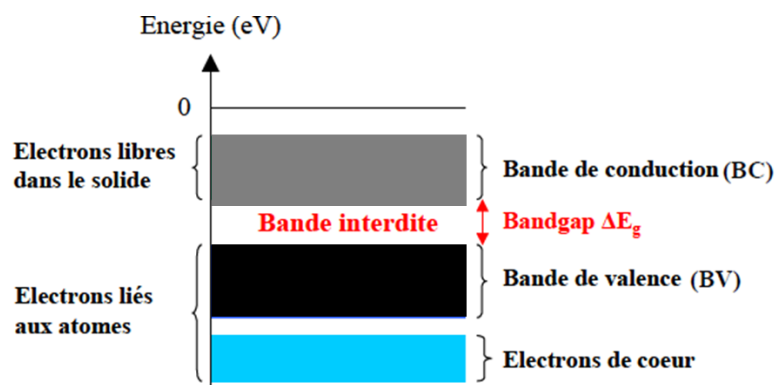


Figure III.4 : Diagramme énergétique des bandes d'un cristal (répartition électronique).

Pour les matériaux isolants, la bande de valence est remplie d'électrons et la bande de conduction est totalement vide. La distance entre

ces deux bandes est très grande et l'énergie nécessaire pour déplacer un électron de la bande de valence vers la bande de conduction est très grande et dépasse généralement les 9 eV (Figure III.5).

Les matériaux qui nous intéressent sont les semi-conducteurs. Dans ces matériaux, la distance séparant la bande de valence de la bande de conduction est beaucoup plus petite que dans le cas des isolants. Pour transférer un électron de la bande de valence à la bande de conduction, il faut fournir une énergie supérieure à seulement 1-3 eV (Figure III.5).

Enfin, dans le cas de conducteurs, la bande de conduction et de valence s'interpénètrent et donc il n'y a pas de bande interdite. La bande de conduction est alors partiellement pleine et la conduction du matériau est élevée (Figure III.5).

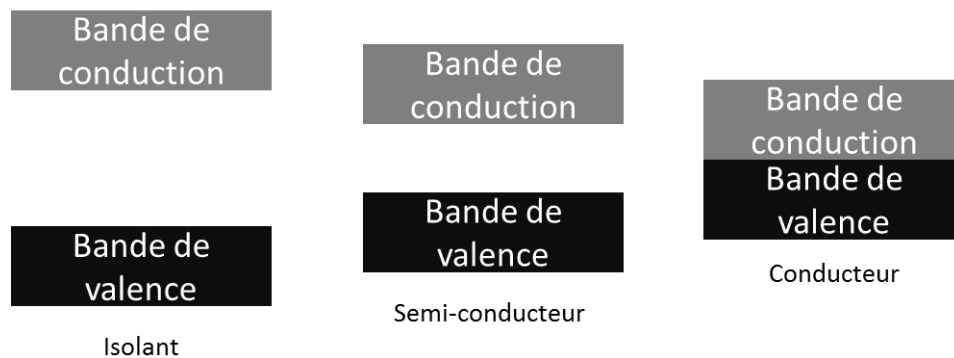


Figure III.5 : Bandes d'énergie pour les matériaux isolants, semi-conducteurs et conducteurs

## 2.2. Propriétés optiques et influence de la taille

L'intérêt principal des nanomatériaux réside dans le fait que de nouvelles propriétés liées à la taille nanométrique vont apparaître, et que ces propriétés vont varier en fonction des dimensions et de la forme de ces nano-objets [151,152].

Pour les nano-objets à base de semi-conducteurs, ces variations trouvent leur explication dans un effet de taille nommé le confinement quantique. Dans un cristal massif, les propriétés du matériau sont indépendantes de la taille et ne vont être fonction que de sa composition chimique. Dans le cas d'un semi-conducteur massif, on peut exciter un électron de la bande de valence et le faire passer dans la bande de conduction par un apport d'énergie au moins égal à la bande interdite du matériau.

Pour les semi-conducteurs nanométriques comme les QDs c'est essentiellement la taille qui conditionne les propriétés physiques. Cette caractéristique a suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique



qui a pu montrer qu'il était possible de changer la valeur de l'énergie de la bande interdite par simple variation des dimensions des particules. Ainsi, la bande interdite va s'accroître au fur et à mesure de la diminution de la taille des QDs. Il en résultera des profils d'émission de fluorescence caractéristiques d'une taille donnée, l'ensemble du spectre de fluorescence pouvant être couvert (Figure III.6).

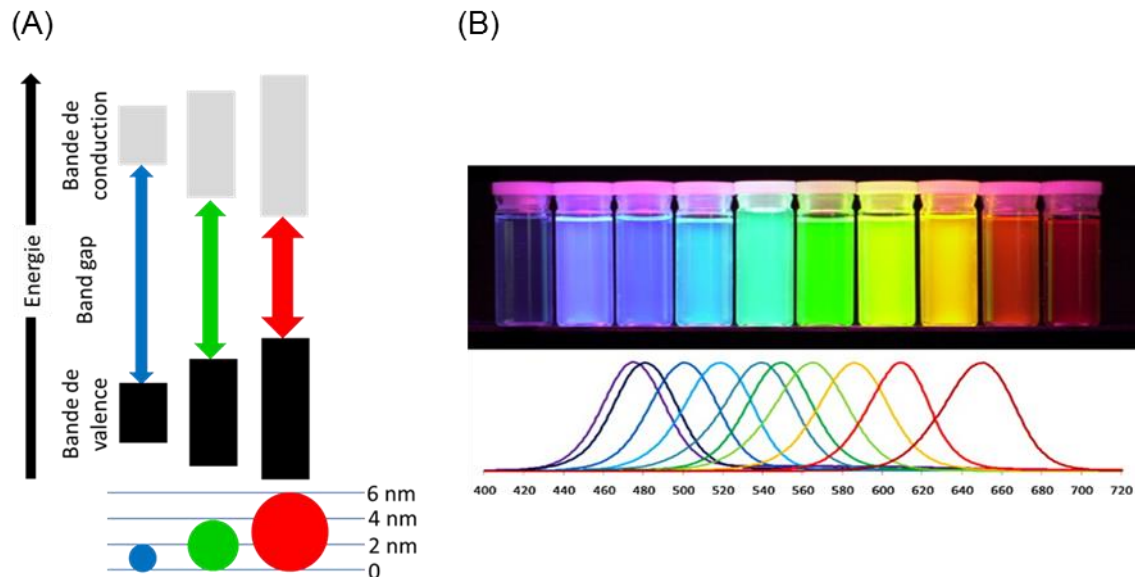


Figure III.6 : (A) Evolution de la bande interdite (Band gap) en fonction de la taille  
(B) Spectre d'émission de QD Cd/Se ZnS de différentes tailles.

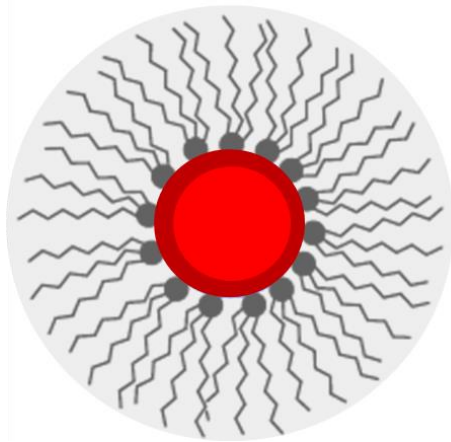
### 3. Fonctionnalisation des QDs par des biomolécules

En fonction de leur mode de synthèse, les QDs sont obtenus stabilisés par :

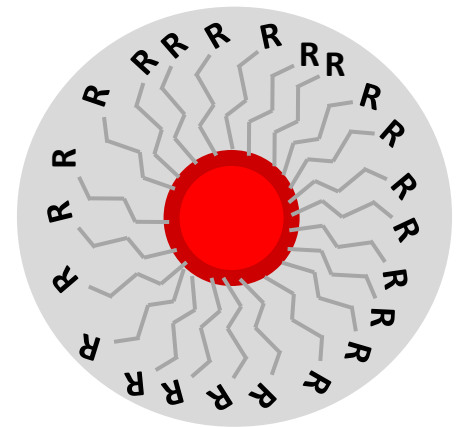
- des ligands hydrophobes tels que l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO), de trioctylphosphine (TOP) ou encore l'hexadécylamine (HDA) dans le cas de la synthèse organométallique (Figure III.7) [153]. Leur utilisation dans des applications biologiques nécessitera de les rendre solubles dans l'eau soit par échange de ligands [154] avec des molécules hydrosolubles soit par micellisation par des molécules amphiphiles [155-157].
- des ligands hydrophiles porteurs de fonctions alcool, acide ou amine dans le cas de la synthèse hydrothermale (Figure III.7 [158]).

Ils peuvent être préparés en laboratoire bien que leur synthèse soit assez drastique et nécessite un certain savoir-faire, mais de nombreux QDs sont également commercialisés. Quelle que soit leur provenance, leur utilisation

biologique nécessite généralement une étape supplémentaire de fonctionnalisation.



**QDs hydrophobes  
(Synthèse organométallique)**



**QDs hydrophiles  
(Synthèse hydrothermale)  
R = OH, COOH, NH<sub>2</sub>**

Figure III.7: QDs hydrophobes et QDs hydrophiles.

La fonctionnalisation des QDs par des biomolécules (anticorps, protéines, acides nucléiques) est indispensable pour que ces sondes fluorescentes puissent interagir sélectivement avec une cible donnée. Les stratégies utilisées doivent conserver l'activité des biomolécules et surtout leurs propriétés de reconnaissance de leurs cibles cellulaires. Il existe deux grands procédés d'ancrage de biomolécules à la surface de QDs.

### **3.1. Fonctionnalisation par couplage covalent**

Un ancrage de type conjugaison est souvent réalisé, basé sur la formation d'une liaison covalente entre les ligands présents à la surface des QDs et les biomolécules [159,160]. De nombreuses réactions peuvent être utilisées. Ce sont généralement les mêmes que celles permettant la fonctionnalisation des nanoparticules en général. Elles sont résumées dans la figure suivante (Figure III.8) :

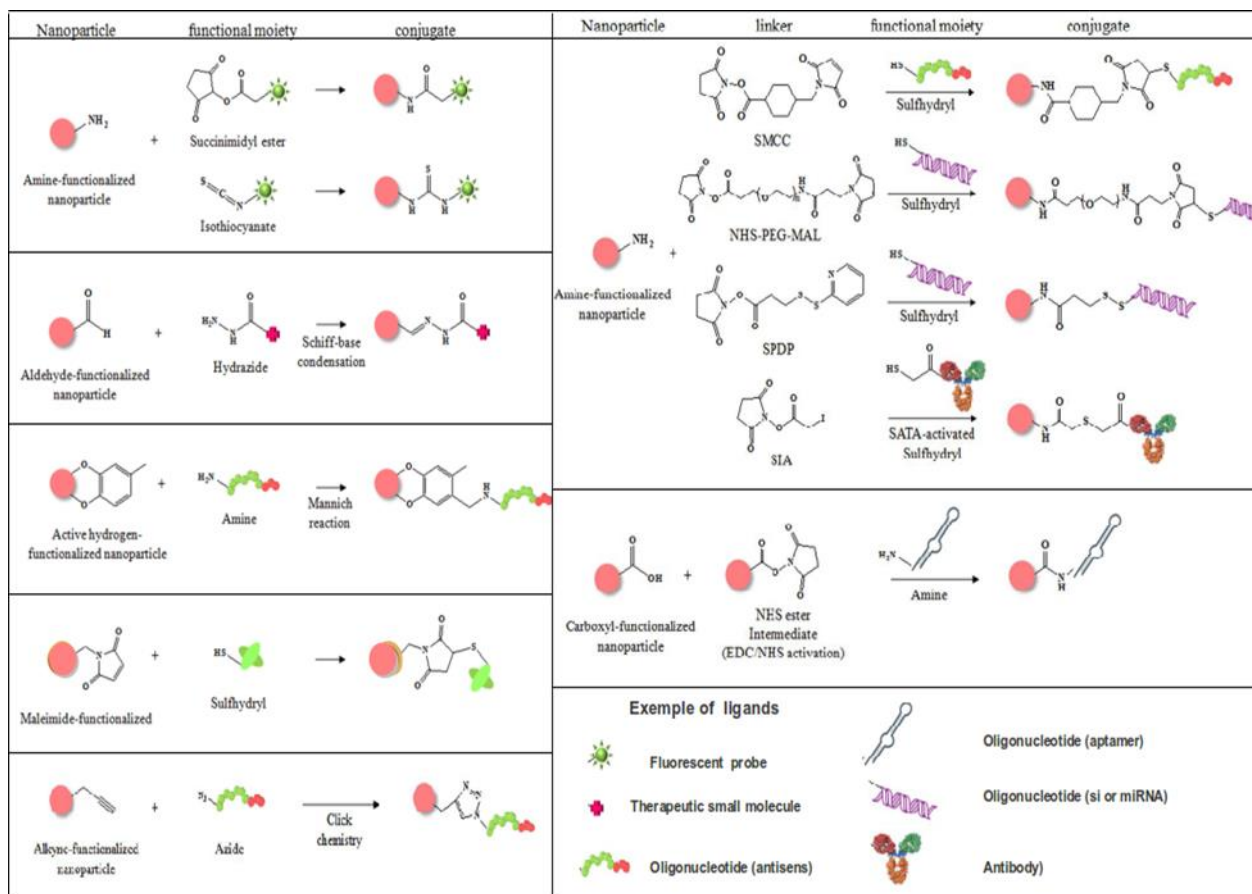


Figure III.8 : Exemple de fonctionnalisation par liaison covalente.

Quelle que soit la réaction choisie, cette stratégie de fonctionnalisation nécessite de faire de la chimie à la surface des nanoparticules ce qui n'est pas trivial.

### 3.2. Fonctionnalisation par couplage non covalent

L'intérêt de ces stratégies est qu'elles sont faciles à mettre en œuvre, la fonctionnalisation se faisant par simple mélange des partenaires [161]. La figure suivante montre différents modes de fonctionnalisation par couplage non covalent (Figure III.9).

Les QDs peuvent être fonctionnalisés par des biomolécules chargées *via* des interactions électrostatiques. Dans ce cas, les QDs sont synthétisés de manière à porter une charge complémentaire à celle de la biomolécule. Ce type d'interactions sera cependant très dépendant du pH et de la force ionique.

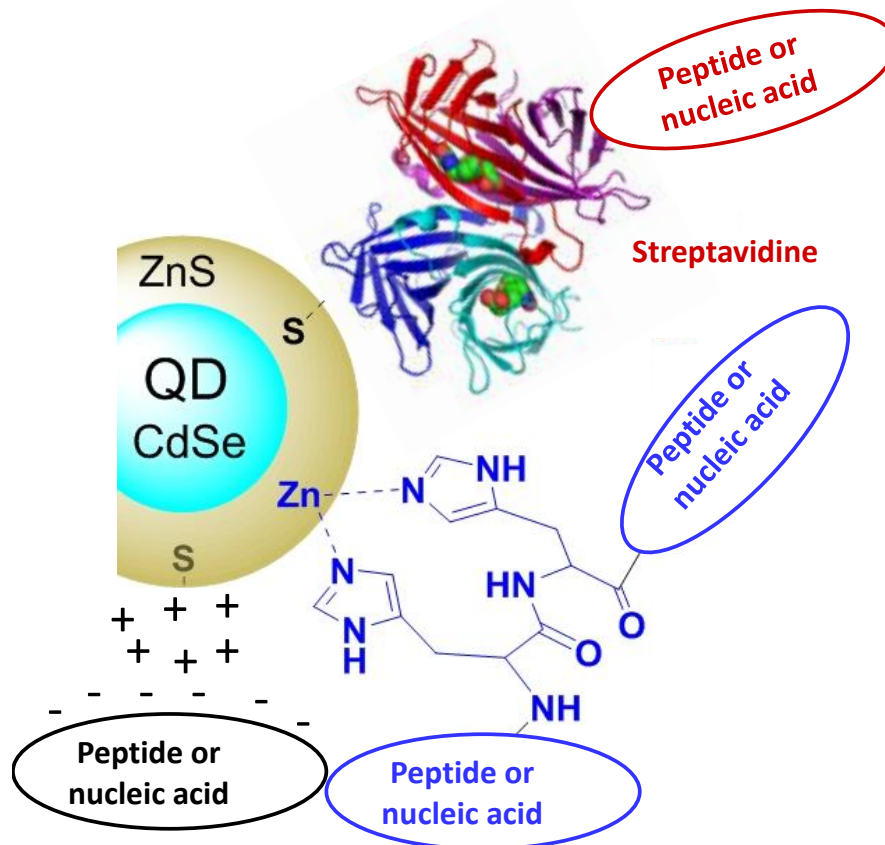


Figure III.9: Fonctionnalisation par liaison non covalente.

Une autre fonctionnalisation par couplage non covalent exploite la grande affinité et spécificité du couple antigène/anticorps formé par la streptavidine et la biotine. Dans ce cas, la force de liaison est telle qu'elle s'approche d'une liaison covalente. Cependant la streptavidine est une protéine qui possède une taille avoisinant celle des QDs induisant un grand encombrement stérique.

Il est également possible de fonctionnaliser les QDs par la formation d'interactions de coordination entre la surface métallique des QDs et des acides aminés de type histidine. Cependant cette méthode nécessite d'introduire cinq à six unités histidine sur les biomolécules (tag ou étiquette histidine).

#### 4. Applications biomédicales des QDs

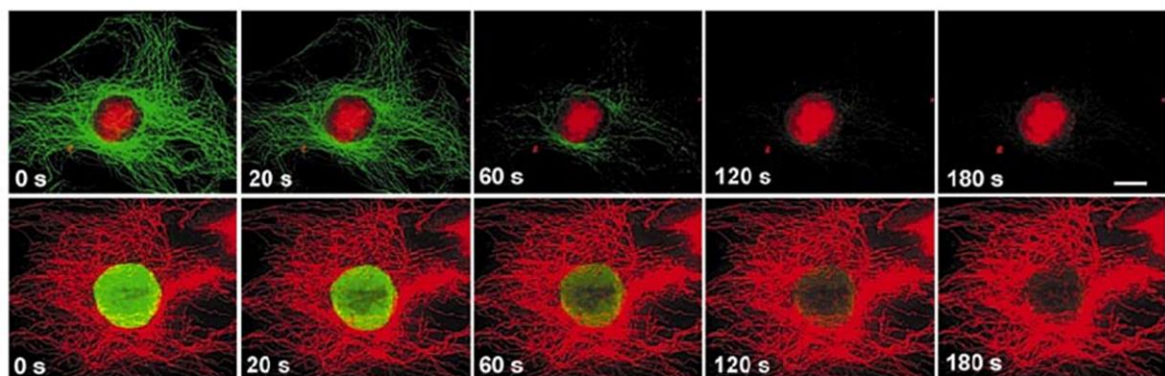
Les QDs, grâce à leurs propriétés optiques remarquables, représentent une alternative intéressante aux fluorophores organiques classiques dans les applications biomédicales [162-164].

Contrairement à eux, les QDs possèdent tous, quelle que soit leur taille, un spectre d'absorption large, avec une section efficace élevée dans le bleu et l'ultra-violet ce qui permet de les exciter simultanément avec une seule source. Cette caractéristique peut être exploitée dans des analyses en multiplexes.

Les QDs possèdent des spectres d'émission fins, de longueur d'onde spécifique de leur taille. Les QDs de grande taille émettent dans le proche infra-rouge ce qui permet, couplé à leur bon rendement quantique (50 à 80%) de faire de l'imagerie non invasive dans les tissus épais et en profondeur.

Les QDs sont également de bons donneurs pour le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET), qui correspond à un transfert non radiatif d'énergie entre deux fluorophores.

Un autre avantage fondamental des QDs par rapport aux fluorophores organiques est leur grande résistance au photoblanchiment qui permet d'observer un QD unique pendant plusieurs minutes et d'étudier des phénomènes dynamiques avec des durées d'observation plus longues (Figure III.10). Cette propriété, couplée à leurs bons rendements quantiques et à leurs grandes sections efficaces d'absorption, a notamment permis l'utilisation de QDs dans le suivi de molécules uniques.



Haut: Noyau QD-630, Microtubules Alexa 488  
Bas: Noyau Alexa 488, Microtubules QD-630

Figure III.10 : Illustration du photoblanchiment des fluorophores classiques par rapport aux QDs [152].

Comme le montre tous ces exemples, les QDs ont donc un très grand potentiel pour les applications biologiques.

Dans ce cadre, des QDs fonctionnalisés par des oligonucléotides ont été développés. Ces nanoplateformes sont généralement préparées par conjugaison des biomolécules sur les QDs. Cependant plusieurs exemples

décrivent des fonctionnalisations par interactions non covalentes souvent plus simples à mettre en œuvre. Les oligonucléotides étant des molécules chargées négativement, la stratégie de fonctionnalisation repose le plus souvent sur le développement d'interactions de charges avec le QD. L'utilisation d'étiquettes histidine liées à un oligonucléotide et du couple biotine/streptavidine a également été reportée. Cependant, ces différentes plateformes ne permettent pas de placer beaucoup de biomolécules en surface. Par exemple dans le cas de QDs fonctionnalisés par interactions de charge, il a été montré que cinq ou six oligonucléotides (de 20 nucléotides) au maximum pouvaient être adsorbés à la surface du QD.

Malgré l'utilisation avec succès d'ONA ancrés dans des membranes de liposomes par effet hydrophobe, aucune étude relative à la fonctionnalisation de QDs par ancrage d'ONA à leur surface n'a été décrite à ce jour [165].

### III. miARN cible

Compte tenu de sa surexpression ubiquitaire dans de nombreux cancers, miR-21 (Cf chapitre I) a été choisi comme cible pour construire la nanoplateforme envisagée. Les ONA préparés sont donc des anti-miARN à séquence complémentaire de celle de miR-21. Leurs structures ont été stabilisées par l'introduction de modifications chimiques de type LNA. Ces variations ont permis de protéger les oligonucléotides des nucléases et d'élever la température de fusion des duplexes miARN-anti-miARN formés, ce qui traduit une augmentation de la stabilité de ces duplexes. Une inhibition renforcée des miARN peut ainsi être obtenue.

### IV. Mise en place de la nanoplateforme

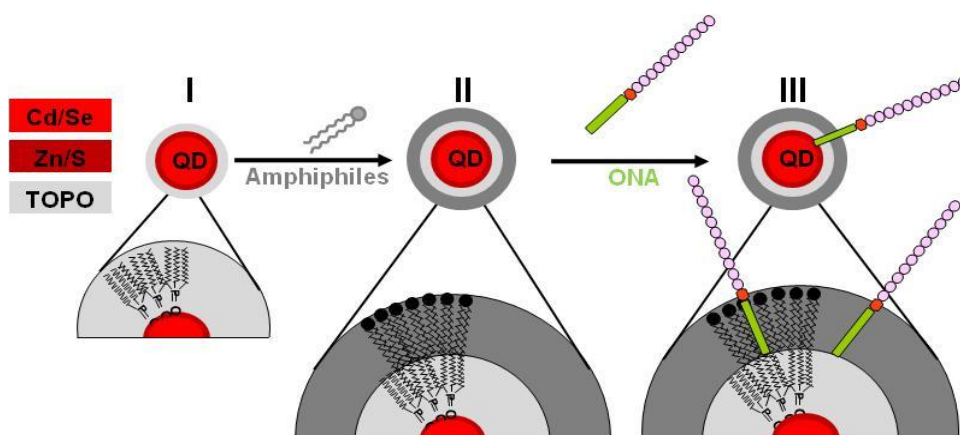


Figure III.11 : Nanoplateforme basée sur les QDs.

La mise en place de la nanoplateforme a requis deux étapes principales (Figure III.11) :

- une étape de solubilisation dans l'eau par formation de micelles
- une étape d'ancrage des ONA à la surface des QDs

## **1. Etape de solubilisation (formation de micelles)**

L'originalité de notre approche a consisté à fonctionnaliser les QDs par un oligonucléotide en exploitant l'effet hydrophobe. Les ONA devaient s'ancrer *via* leur partie lipidique dans la paroi hydrophobe des QDs.

Les QDs utilisés dans le cadre de ce travail étaient commerciaux et provenaient de chez Evidentech. Il s'agissait de QDs constitués d'un cœur CdSe et d'une coque de ZnS. Ils étaient recouverts de ligands hydrophobes, plus précisément d'un mélange de TOP et de TOPO et faisaient une taille de 6 nm (émission dans le rouge à 620 nm).

Pour, à la fois renforcer leur caractère hydrophobe en surface afin de favoriser l'ancrage des ONA et les rendre solubles dans l'eau, les QDs ont été recouverts de molécules amphiphiles. Les micelles obtenues contenaient donc le cœur QD stabilisé par les ligands TOP ou TOPO et entouré d'une couche de molécules amphiphiles.

### **1.1. Molécules amphiphiles utilisées pour la solubilisation**

Les molécules amphiphiles sélectionnées pour la solubilisation des QDs étaient un phospholipide classique commercial, la DOPC (1,2-DiOleoyl-sn-glycéro-3-PhosphoCholine), classiquement utilisé pour la préparation de micelles et des lipides plus originaux synthétisés au laboratoire, les nucléolipides PUPC (Palmitic Uridine PhosphoCholine) et PUOH (Palmitic Uridine). Ces molécules possèdent une tête nucléosidique sur laquelle sont greffées des chaînes lipidiques. Toutes ces molécules étaient globalement neutres, zwitterioniques (DOPC et PUPC) ou non chargées (PUOH) (Figure III.12).

Ont ainsi été préparées des nanoplateformes QD-DOPC, QD-PUPC et QD PUPC/PUOH.

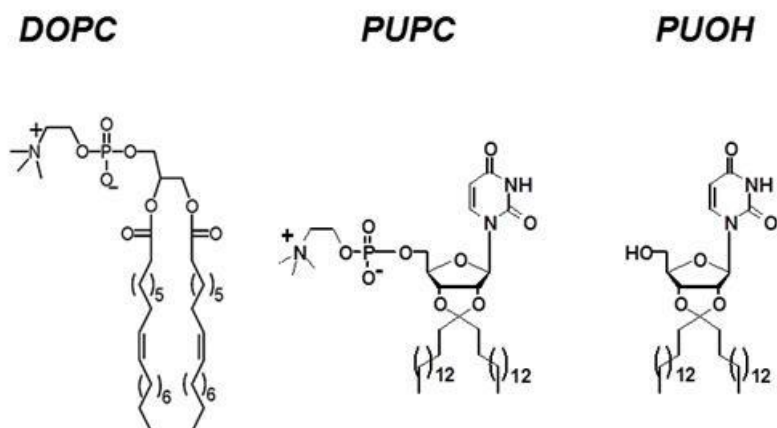


Figure III.12 : Molécules amphiphiles utilisées pour la solubilisation des QDs.

Cependant l'optimisation de l'étape de formation de micelles a été faite avec la DOPC commerciale (nanoplateforme QD-DOPC).

## 1.2. Optimisation et caractérisations physico-chimiques

Cette première étape de solubilisation a été cruciale dans la mise en place de la nanoplateforme. Elle devait conduire à la formation de QDs parfaitement solubles et individualisés, non agrégés, stables dans l'eau. Les propriétés de fluorescence ne devaient pas être altérées par la présence des lipides. Pour contrôler la stabilité colloïdale des micelles QD-DOPC préparées, des expériences de caractérisations physico-chimiques ont été effectuées:

- mesure de la taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS)
- observation de la taille et de la forme par microscopie électronique à transmission (MET)
- mesure de la charge de surface (potentiel zeta) par diffusion électrophorétique (DLS)
- mesure de l'intensité de fluorescence par spectroscopie de fluorescence

Ces caractérisations nous ont permis d'optimiser les protocoles de solubilisation pour obtenir les nano-objets souhaités.

### 1.2.1. Protocole initial et caractérisation des objets obtenus

La solubilisation des QDs par formation de micelles est bien décrite dans la littérature. Elle est basée sur le même principe que la préparation de



de liposomes, c'est-à-dire l'hydratation d'un film lipidique préalablement formé. Mais dans ce cas, le film lipidique contient les lipides (amphiphiles) et les QDs hydrophobes. Il est obtenu après dissolution des QDs et des lipides dans une solution de chloroforme puis évaporation (Figure III.13). L'hydratation du film va favoriser l'organisation des chaînes hydrophobes de manière à minimiser leurs interactions avec les molécules d'eau. Les ligands présents à la surface des QDs et les chaînes grasses des lipides vont se regrouper par effet hydrophobe. Les têtes polaires vont, elles, être exposées au solvant autorisant la solubilisation des nano-objets dans l'eau.

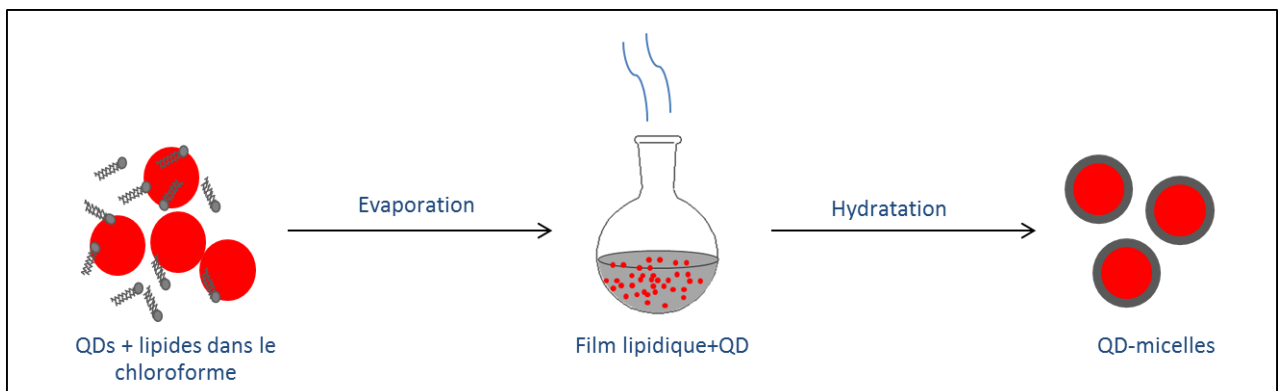


Figure III.13 : Protocole de solubilisation par des lipides.

La première formulation utilisée a été inspirée par Dubertret *et al.* Les ratios de QDs et de lipides utilisés étaient environ de 1 mole de QD pour 100 moles de lipides [165].

Les premiers QDs ainsi solubilisés ont été caractérisés. Les résultats sont présentés dans la Figure III.14.

#### ➤ La taille

Les suspensions ne contenaient pas de QD individuellement dispersés mais pour la plupart des agrégats de tailles variables. En effet après l'étape de centrifugation requise pour éliminer les possibles agrégats formés, nous avons observé un culot très important, ce qui signifiait que la suspension était essentiellement composée de grosses particules. Cette observation a été confirmée par la mesure de la taille des particules par DLS qui avoisinait les 100 nm. Une deuxième confirmation a été apportée par les expériences de MET qui ont également révélé la présence d'importants agrégats de QDs.

#### ➤ La charge

La charge des objets était de + 25 mV. Il est intéressant de remarquer que l'utilisation de lipides zwitterioniques a conduit à un potentiel de surface

différent de 0 mV. Cette valeur peut être attribuée aux groupes ammoniums qui se localisent à la périphérie des nano-objets.

➤ L'intensité de fluorescence

La comparaison des intensités de fluorescence des QDs organiques et des QDs solubilisés en phase aqueuse a montré que les propriétés de fluorescence des QDs-micelles étaient fortement modifiées. En effet, une diminution de l'intensité de fluorescence de près de 75% a été observée.

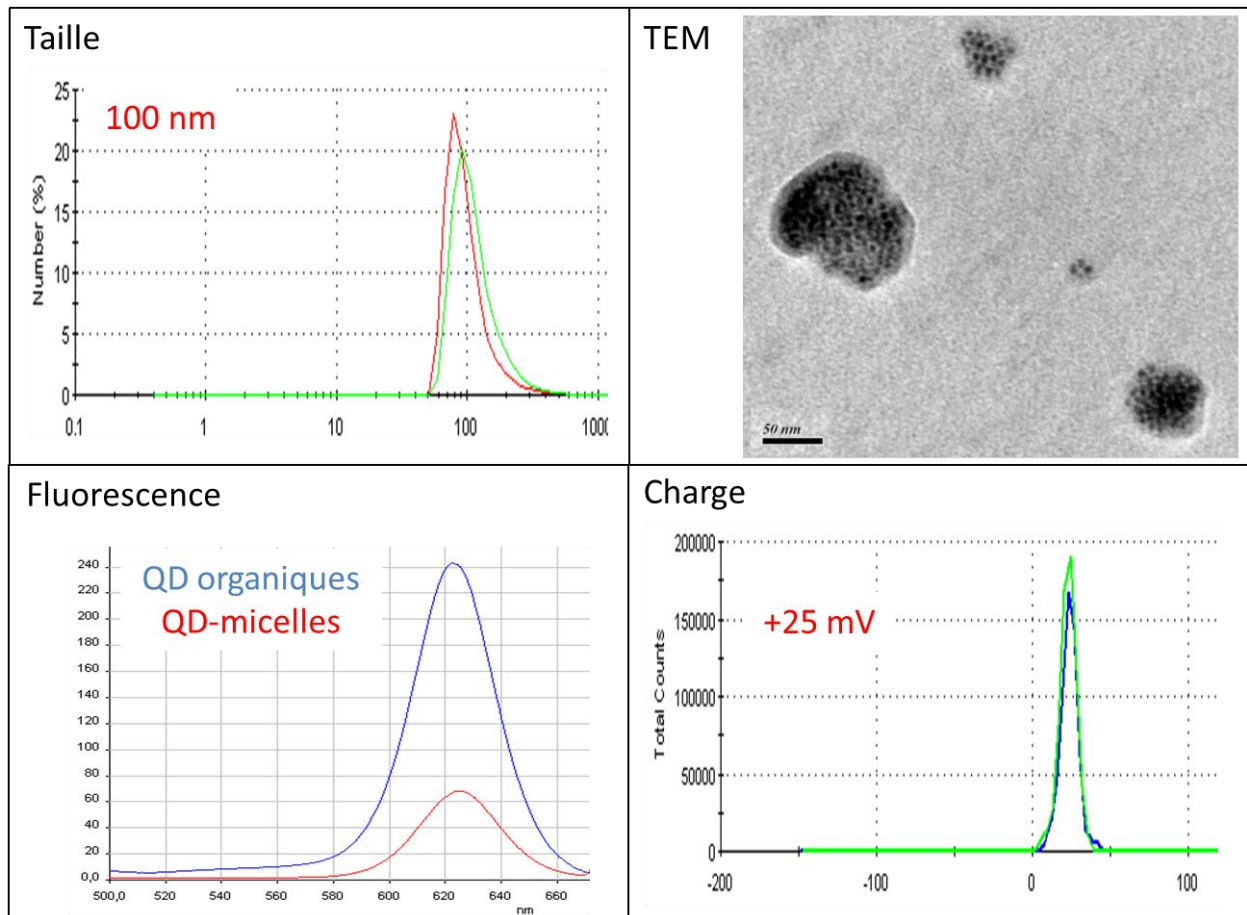


Figure III.14 : Caractérisation physico-chimique des QD-micelles (protocole initial)


### 1.2.2. Paramètres influençant la solubilisation

Afin d'améliorer notre protocole de micellisation, nous avons essayé de déterminer les paramètres pouvant influencer la solubilisation des QDs par les lipides.

➤ La quantité de lipides

Une des premières raisons qui peut expliquer la mauvaise micellisation est le ratio QD/lipides. En effet une quantité insuffisante de lipides peut conduire à la formation d'agrégats s'il n'y a pas assez de molécules amphiphiles pour individualiser chaque QD.

Des quantités croissantes de lipides ont donc été utilisées pour limiter la formation d'agrégats. La mesure de la taille des objets obtenus a permis de déterminer le meilleur ratio QD/lipides qui est de 1 pour 10000 (Tableau III.1).



Eq QD	1	1	1	1
Eq Lipides	250	500	1000	10000
taille (nm)	90	115	67	15

Tableau III.1 : Tailles des QD-micelles en fonction du ratio QD/lipides.

D'autres paramètres influençant la solubilisation ont été identifiés :

➤ L'élimination des solvants organiques

Les QDs commerciaux sont fournis dans le toluène ce qui nécessite une étape préliminaire d'évaporation avant leur dissolution dans le chloroforme. La présence de traces de solvants organiques peut compromettre la formation du film et donc altérer l'étape de micellisation. L'évaporation du toluène a donc été améliorée.

➤ La surface de dépôt du film

La formation du film mixte lipides-QDs est une étape cruciale car de sa qualité va dépendre la bonne micellisation des QDs. En favorisant la formation d'un film très fin, l'encapsulation de QDs individuels est privilégiée. Pour cela il a fallu augmenter la surface de dépôt du film.

➤ L'apport d'énergie

Comme pour la préparation des liposomes, l'énergie apportée par la sonication ainsi que par le chauffage permet d'améliorer la formation des QD-micelles. Le temps de sonication et la température de chauffage ont donc été améliorés.

### 1.2.3. Protocole optimisé et caractérisation des objets obtenus

En modifiant les différents paramètres cités précédemment, un protocole optimisé a été mis au point. Il a conduit à la bonne micellisation des QDs qui ont été caractérisés par la suite.

Comme le montre la [Figure III.15](#), la taille est passée à 15 nm, ce qui correspond effectivement à des QDs individuellement solubilisés. Le potentiel de surface est resté identique (+ 25 mV).

L'intensité de fluorescence a été quasi-équivalente à celle des QDs organiques, par différence avec ce qui était observé avec le premier protocole.

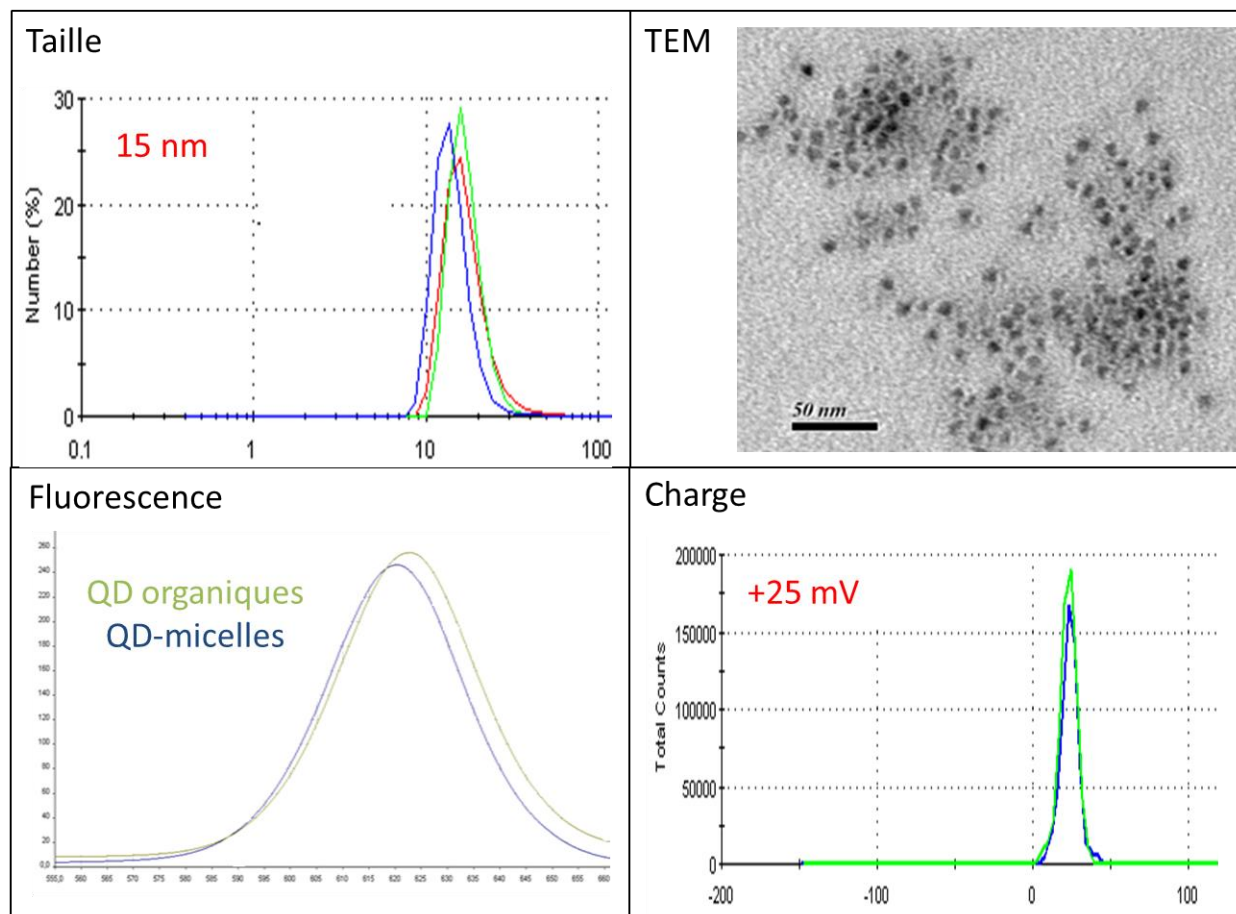


Figure III.15 : Caractérisation physico-chimique des QD-micelles (protocole optimisé)

Ce protocole optimisé a été appliqué à la micellisation des QDs par les nucléolipides PUPC et PUPC/PUOH (il s'agit d'un mélange 25/75 car PUOH n'est pas assez hydrophile pour solubiliser, seul, des QDs) disponibles au laboratoire. Le tableau ([Tableau III.2](#)) suivant montre les caractéristiques des différents objets obtenus après solubilisation.

QD-micelles	Taille (nm)
QD-DOPC	14 ± 2
QD-PUPC	34 ± 2
QD-PUPC/PUOH (25:75)	65 ± 1

Tableau III.2 : Tailles des QD-micelles en fonction des lipides utilisés pour la micellisation.

La différence de taille obtenue vient en partie du fait que les nucléolipides PUPC et PUOH peuvent former des membranes plus compactes et plus épaisses que les lipides correspondants non nucléosidiques [167,168]. Cette caractéristique est liée aux nombreuses interactions qui se développent au niveau des têtes nucléosidiques de ces molécules au sein d'une membrane.

### 1.3. Purification des QD-micelles

A la fin de cette étape, trois types d'objets étaient présents dans la suspension aqueuse : des QD-micelles individuels, des agrégats de QDs résultant d'une mauvaise micellisation et des lipides en excès sous forme de liposomes ou de micelles.

Les agrégats de QD ont été éliminés par centrifugation à 14000 rpm pendant 10 min. Avec le protocole initial de solubilisation, la majeure partie (environ 90%) des QDs se retrouvaient dans cette fraction. L'optimisation du protocole a permis de passer de 10% à 55% de QD bien individualisés, sous forme de QD-micelles.

Les lipides en excès ont été supprimés par ultracentrifugation à 300 000 g pendant 25 min dans une solution de saccharose à 20% dans des tubes de polycarbonate. Après ultracentrifugation, une bande bien définie correspondant aux QDs a été observée à l'aide d'une lampe UV. Cette bande a été soigneusement récupérée et le saccharose résiduel, éliminé par centrifugations successives à 19 000 g pendant 10 min à l'aide de tubes Vivaspin Sartorius (cutoff de 10 K) avec de l'eau. Les QD-micelles ont ensuite été stockés dans de l'eau à 4 ° C dans l'obscurité

## 2. Etape de fonctionnalisation

Dans le cadre de notre approche, nous avons fait le choix de fonctionnaliser les QDs par insertion d'ONA dans la couche lipidique qui recouvre les QDs. La queue hydrophobe de ces oligonucléotides modifiés doit assurer l'ancrage de la biomolécule à la surface de la nanoplateforme. Cette approche peu fréquente mais très prometteuse, n'a jamais été utilisée pour la fonctionnalisation de nanoparticules avec des oligonucléotides.

### 2.1. ONA utilisés pour la fonctionnalisation

Les ONA utilisés pour la fonctionnalisation des QDs possèdent la séquence anti-miR-21. Cette séquence, complémentaire de celle de miR-21 a été optimisée et chimiquement modifiée avec des bases LNA et DNA.

Les molécules se distinguent par leur partie hydrophobe, qui est constituée des résidus C18, diC15 ou Chol, comme le montre la [Figure III.16](#) et le [Tableau III.3](#). Ce sont les lipides les plus hydrophobes qui ont été sélectionnés dans le cadre de cette application, la cohésion de la nanoplateforme QD ne reposant que sur l'effet hydrophobe entre les QDs et les ONA.

Pour faciliter la mise en place de cette plateforme, un ONA modèle a également été utilisé. Cet ONA avait antérieurement montré ses capacités à s'ancrer par effet hydrophobe dans la paroi d'un liposome. Il est constitué d'une séquence de 14 nucléotides ADN conjuguée en 5' à un motif diC15.

nom	Oligonucléotide	Couplage	Partie hydrophobe
model-diC15-2	5' GCCTGTTGTGAGCC 3'	cétal	diC15
model-chol	5' GCCTGTTGTGAGCC 3'	triazole	chol
model-C18	5' GCCTGTTGTGAGCC 3'	triazole	C18
antimiR21-diC15-2	5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 3'	cétal	diC15
antimiR21-diC15-1	5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 3	triazole	diC15
antimiR21-chol	5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 3	triazole	chol
antimiR21-C18	5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 3	triazole	C18

Tableau III.3 : ONA utilisés pour la fonctionnalisation (**LNA**).

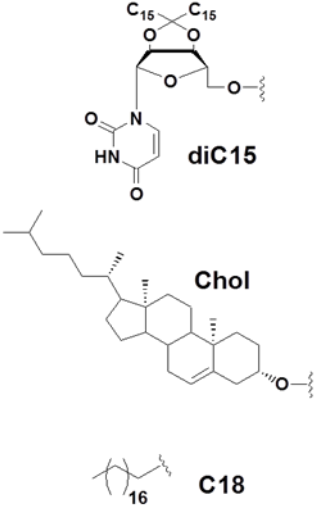
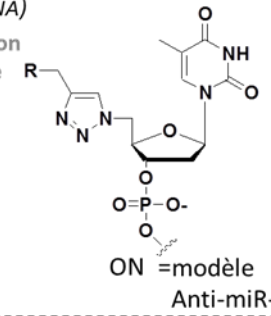
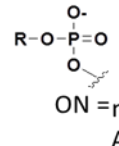
Partie hydrophobe	Oligonucléotide	ONA
 <p>diC15</p> <p>Chol</p> <p>C18</p>	<p>5' GCCTGTTGTGAGCC 3'</p> <p>modèle</p> <p>5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 3'</p> <p>Anti-miR-21</p> <p>B: ADN, <u>B</u>: LNA</p>	<p><b>ONA-1 (5 ONA)</b> Cyclo-addition 1,3 dipolaire</p>  <p>R = C18 diC15 Chol</p> <p>ON = modèle Anti-miR-21</p> <hr/> <p><b>ONA-2 (2 ONA)</b> Cétalisation</p>  <p>R = diC15</p> <p>ON = modèle Anti-miR-21</p>

Figure III.16 : ONA utilisés pour la fonctionnalisation.

Globalement la bioconjugaison des ONA a été faite selon une stratégie pré-synthétique à l'extrémité 5' des oligonucléotides. Les phosphoramidites ont donc été préalablement synthétisés puis couplés à l'oligonucléotide pendant le dernier cycle de synthèse. La réaction principalement utilisée pour préparer les phosphoramidites modifiés par le cholestérol, la chaîne en C18 et le motif diC15 a été une cyclo-addition 1,3-dipolaire. Le motif diC15 a également été introduit *via* une réaction de cétalisation.

## 2.2. Protocole et caractérisations physico-chimiques

### 2.2.1. Protocole

La fonctionnalisation a été faite par simple incubation des QDs solubilisés avec les ONA, à 37°C pendant 1 heure. Elle a été réalisée dans l'eau et dans un tampon phosphate.

Différents ratios ONA/QD ont été utilisés allant de 5 à 500 équivalents en moles d'ONA par mole de QD. Cette optimisation a été faite sur l'ONA modèle (portant un motif diC15) connu pour s'ancrer à la surface des liposomes.

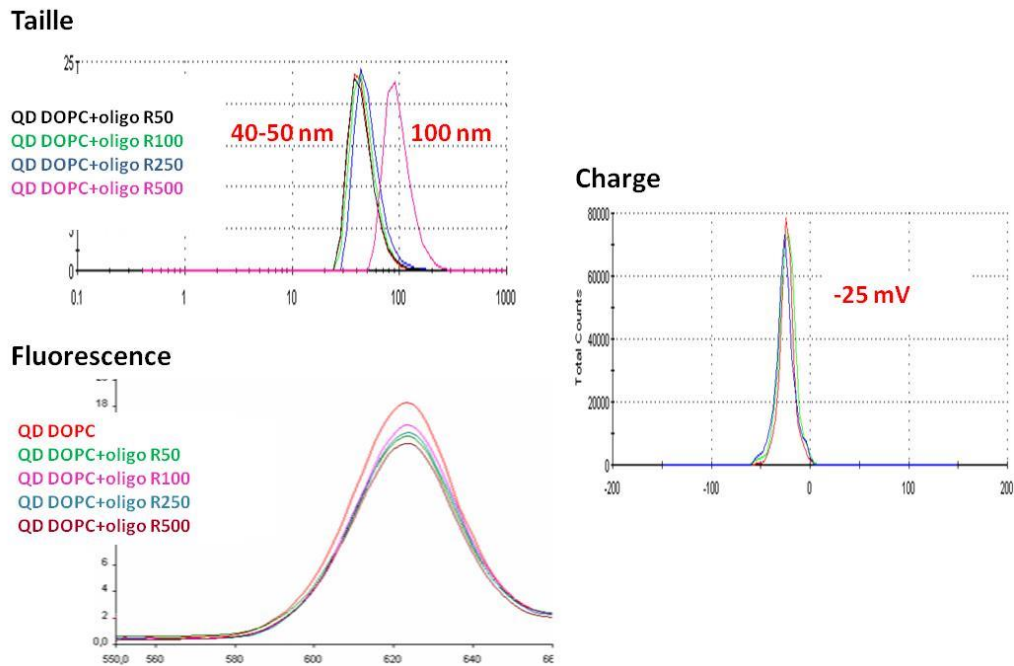


Figure III.17 : Optimisation du ratio ONA/QD, mesure de la taille.

Pour des ratios compris entre 50 et 250, la taille des particules était à peu près constante proche de 50 nm. Par contre, lorsque le ratio a atteint 500 une nette augmentation de taille a été observée (100 nm) probablement due à des problèmes d'agrégation (Figure III.17). La quantité d'ONA ajoutée a eu peu d'impact sur les propriétés de fluorescence des systèmes. Par contre, la fonctionnalisation a modifié le potentiel zeta de surface qui est devenu négatif (- 25 mV). Ceci est lié à la composition polyanionique des oligonucléotides qui habillent la surface des QD-micelles (Figure III.17).

Les ONA en surface du QD devaient pouvoir s'hybrider sur leur miARN cible. Une trop grande concentration d'oligonucléotides aurait pu altérer cette reconnaissance. C'est pourquoi le ratio 50 a été sélectionné pour la suite de l'étude. Il a été appliqué à l'oligonucléotide anti-miR-21 correspondant à l'ONA modèle c'est-à-dire substitué en 5' par un motif diC15 introduit par réaction de cétylation.



## 2.2.2. Caractérisation physico-chimique des objets obtenus

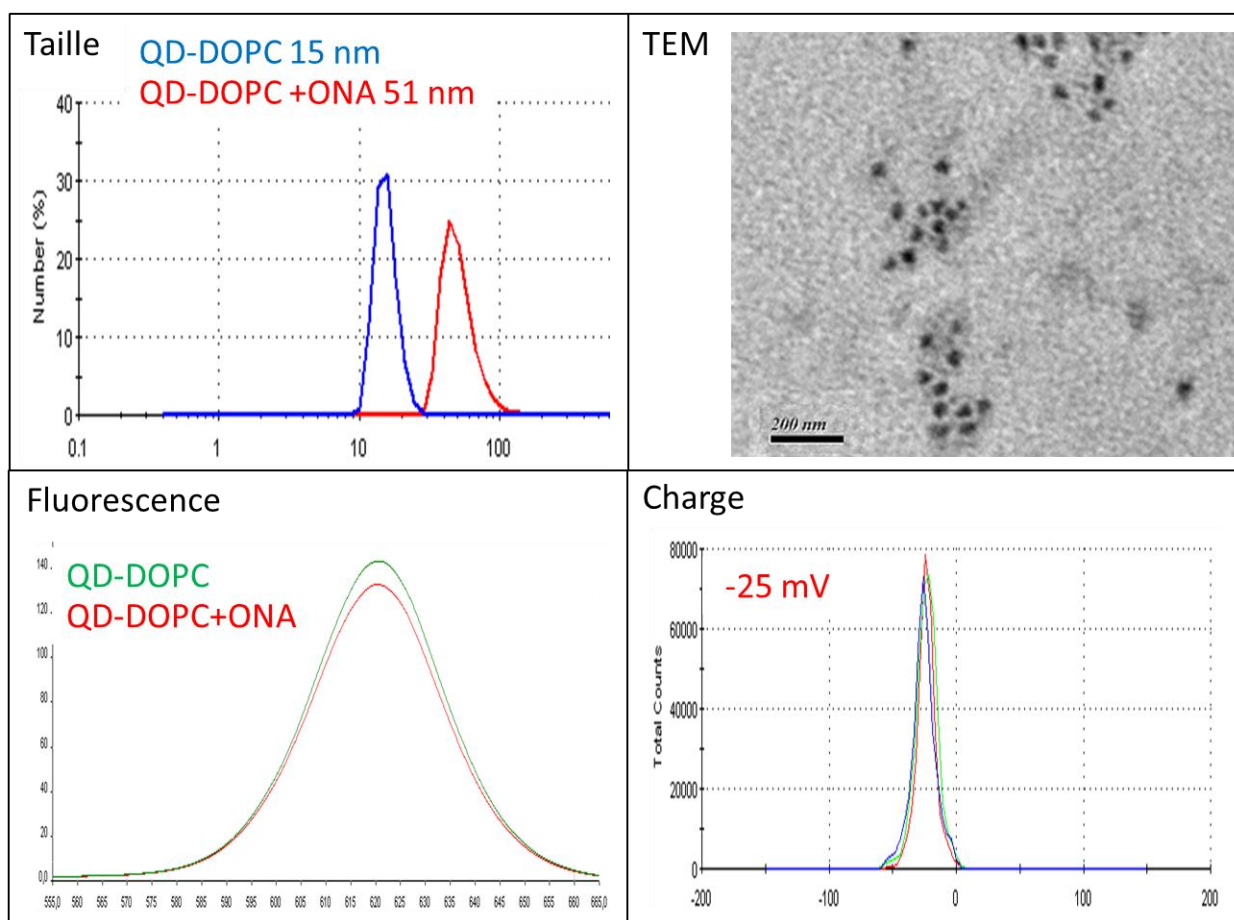


Figure III.18 : Caractérisation physico-chimique des QD-DOPC-ONA.

Dans ce cas, la plateforme obtenue avait une taille de 51 nm mesurée par DLS et confirmée par MET. Les propriétés de fluorescence étaient très proches de celles des QDs organiques et le potentiel de surface est resté négatif à -25 mV. L'augmentation de la taille des QDs après fonctionnalisation a montré que les ONA étaient bien ancrés sur la nanoplateforme QD (Figure III.18).

## 2.2.3. Estimation du nombre réel d'ONA par QD

A la fin de la fonctionnalisation, la suspension a été filtrée par centrifugation (tubes Vivaspin Sartorius) pour éliminer les ONA en excès. La mesure de l'absorbance à 260 nm du filtrat, a permis de déterminer la quantité d'ONA en excès puis d'en déduire la quantité de molécules greffées à la surface des QDs. Il y a en moyenne 20 ONA pour 1 QD. Ce résultat démontre l'intérêt de cette stratégie par rapport au greffage par interactions électrostatiques où un maximum de 5 molécules d'ADN par QD pouvait être lié.

## **V. Etude de l'hybridation *in vitro***

L'objectif a ensuite été de tester la capacité de cette nanoplateforme fonctionnalisée à s'hybrider de manière spécifique avec une séquence complémentaire, *in vitro*. Pour réaliser cette évaluation, la résonance plasmonique de surface (SPR, appareil biacore) qui permet de mesurer les interactions entre biomolécules a été choisie.

### **1. Résonance plasmonique de surface**

Le Biacore exploite le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR) pour analyser l'interaction entre molécules en temps réel. L'approche consiste à immobiliser un des partenaires à la surface d'une biopuce et à faire passer l'échantillon contenant l'autre partenaire en vue d'analyser l'interaction entre les 2 molécules. L'interaction des molécules à la surface du capteur génère un signal qui est proportionnel à la masse liée. La limite de détection atteint des variations de quelques picogrammes ou moins par millimètre carré de surface du capteur.

Plusieurs paramètres de l'interaction entre biomolécules peuvent être étudiés SPR :

- la spécificité de l'interaction
- l'affinité de l'interaction par la détermination de paramètres cinétiques

#### **1.1. Système de détection par SPR**

La résonance plasmonique de surface est un phénomène qui se produit dans les couches minces conductrices à l'interface entre des milieux d'indices de réfraction différents.

La SPR est une méthode de mesure de la liaison d'un analyte en solution sur un ligand immobilisé de manière covalente ou non à la surface d'une fine couche métallique. Cette technique est basée sur une variation de l'indice de réfraction à l'interface, liée à la fixation de l'analyte sur le ligand.

L'indice de réfraction d'un milieu se définit par la vitesse de l'onde électromagnétique observée dans le vide par rapport à celle observée dans le milieu. A l'interface entre deux milieux, la lumière en plus d'être réfractée, se réfléchit et une partie des rayons lumineux émerge de l'interface. Lorsque la lumière incidente est dirigée selon un certain angle (angle de résonance) sur un métal riche en électrons libres tel que l'or ou l'argent, les photons provoquent une oscillation des électrons libres appelée Résonance Plasmonique de Surface. Ces oscillations se caractérisent par une onde évanescente qui est le point central des mesures d'interactions. En effet, une

perturbation de l'onde évanescente, consécutive à l'interaction de biomolécules à la surface du métal va induire une diminution de l'angle de résonance directement mesurable. La variation d'angle de résonance est ainsi directement proportionnelle à la masse des biomolécules interagissant. En SPR,  $1.10^{-4}$  degré de variation d'angle correspond à 1 RU et à  $1 \text{ pg/mm}^2$ .

Le métal (or) est fixé sur des biopuces qui sont constituées de différentes pistes sur lesquelles plusieurs expériences pourront être faites en parallèle. La Figure III.19 illustre le principe de détection de la SPR.

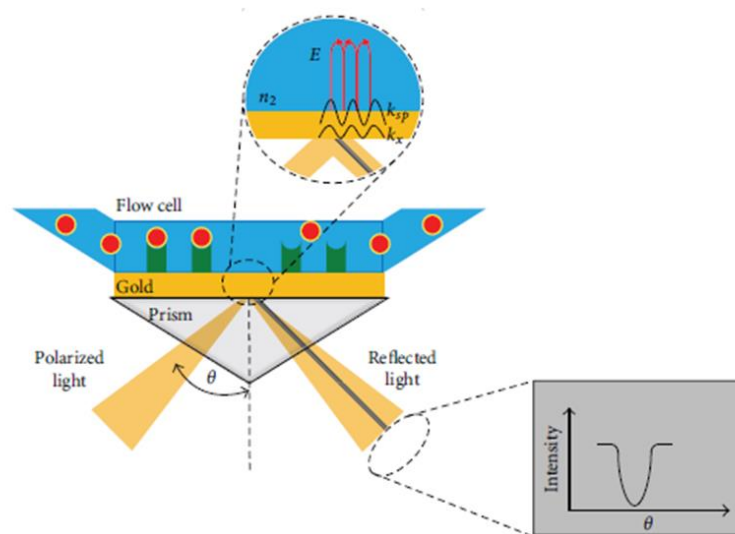


Figure III.19 : Principe générale de la résonance Plasmonique de Surface.

Les appareils commerciaux permettent d'injecter directement l'analyte sur le ligand immobilisé sur la puce : on peut alors suivre, en temps réel et sans marquage préalable des biomolécules, la cinétique d'interaction.

## 1.2. Terminologie et expérience type

Les termes suivants sont généralement utilisés dans le cadre d'expériences avec un Biacore:

- le partenaire de l'interaction qui est immobilisé à la surface de la biopuce est appelé le ligand
- l'analyte est le partenaire qui est injecté sur le ligand immobilisé.
- l'analyse est effectuée par injection de l'analyte sur le ligand fixé à la surface de la biopuce. Il est transporté dans un flux continu de tampon, appelé tampon de course. La réponse est mesurée en unités de résonance (RU). Elle est directement proportionnelle à la quantité d'analyte qui se lie à la surface.
- la courbe obtenue est un sensorgramme, qui correspond au tracé de la réponse en unité de résonance RU en fonction du temps, montrant la

progression de l'interaction. Ce sensorgramme se compose de plusieurs phases :

- à l'injection de la solution, il y a une phase d'**association** caractérisée par le  $k_{on}$  (constante d'association) et qui correspond à l'augmentation du signal, lui-même proportionnel à la quantité de molécules fixées (jusqu'à saturation).
- quand l'injection cesse, les molécules ayant interagi se dissocient par effet de dilution, c'est la phase de **dissociation** caractérisée par le  $k_{off}$  (constante de dissociation).
- enfin une phase de **régénération** a lieu. Elle correspond à l'injection d'un produit capable de rompre totalement l'interaction, sans endommager le ligand. Un nouveau cycle peut alors recommencer.

La Figure III.20 représente un sensorgramme type avec les différentes étapes de l'interaction ligand/analyte.

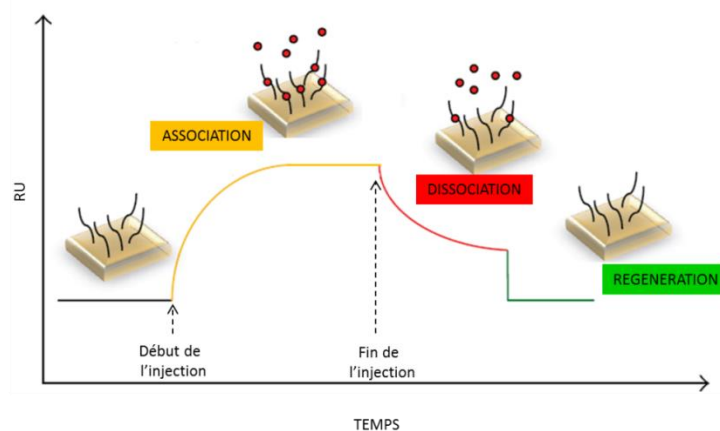


Figure III.20 : Sensorgramme montrant les différentes phases de l'interaction ligand/analyte.

### 1.3. SPR et oligonucléotides

Même si à l'origine, la SPR a été utilisée pour étudier les interactions entre protéines, elle a été largement appliquée à l'analyse des interactions impliquant des oligonucléotides ces 10 dernières années. Il s'agit notamment d'interactions oligonucléotides/protéines, oligonucléotides/petites molécules et entre deux oligonucléotides.

Pour les interactions entre séquences oligonucléotidiques, les ligands sont généralement immobilisés sur la biopuce par un couplage streptavidine-biotine. La séquence complémentaire est injectée dans le flux circulant et va

interagir avec le ligand en formant un duplexe par appariement des bases (Figure III.21).

Dans notre cas, nous avons immobilisé les plateformes QD-ONA à la surface des biopuces, les ONA ancrés sur les QDs constituant alors les ligands (Figure III.21). Nous avons ensuite évalué l'interaction qui a lieu à la surface des QDs, après injection de la séquence complémentaire qui constitue l'analyte. C'est la première fois, à notre connaissance que la formation d'un duplexe à la surface d'une nanoplateforme QD est ainsi analysée par SPR.

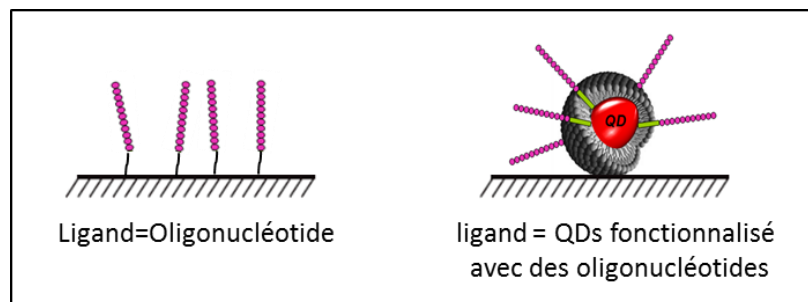


Figure III.21 : Approche classique et originale de l'étude de l'interaction entre oligonucléotides par SPR.

## 2. Expériences de SPR

### 2.1. Choix et activation de la biopuce

L'expérience de SPR commence par l'immobilisation des cibles, dans notre cas les QD-ONA, sur une biopuce. Pour cela, nous avons utilisé une biopuce « L1 ». Elle présente une surface composée d'une matrice de carboxy méthyl-dextran partiellement modifiée par des substituants lipophiles, donnant à la surface des propriétés amphiphiles. La surface fournit des sites pour l'adsorption des membranes lipidiques (par insertion des substituants lipophiles dans la membrane) d'une vésicule ou d'un liposome (Figure III.22).

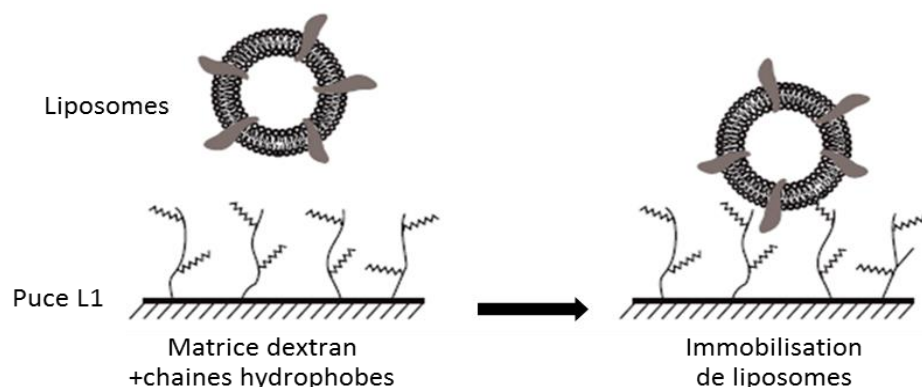


Figure III.22 : Biopuce L1 utilisée pour l'immobilisation de vésicules ou de liposomes.

Les biopuces L1 ont été préparées avant la fixation des QD-ONA par injection d'une impulsion de 1 min d'une solution 40 mM de N-octyl- $\beta$  glucopyranoside (Sigma), puis par deux impulsions de 1 min d'un mélange 50/50 (vol/vol) de 100 mM de HCl et d'isopropanol, à 100 $\mu$ L/min.

La Figure III.23 résume le déroulement de l'expérience qui débute par l'immobilisation des QDs, suivi de l'injection des ligands, en vue d'observer une interaction.

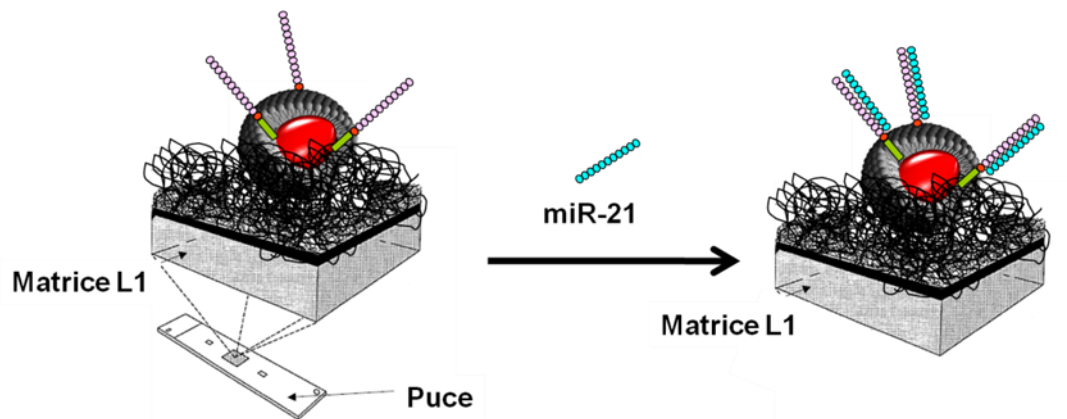


Figure III.23 : Etude de l'hybridation *in vitro* par SPR.

## 2.2. Immobilisation des ligands

Les QDs-micelles non fonctionnalisées (servant de contrôle négatif) et les QD-ONA ont été dilués à 1 $\mu$ g/mL, soit 2.5 nM dans le tampon de course (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 150 mM, pH 7, 20 ° C) et injectés dans le système à un débit de 5 $\mu$ L/min. Après la capture des cibles, une solution fraîchement préparée de soude à 10 mM a été injectée pour éliminer l'immobilisation non spécifique et stabiliser la surface. On a pu ainsi immobiliser entre 3000 et 10000 RU de cibles.

## 2.3. Interactions ligands/analytes

Différents ligands ont été injectés dans le tampon de course à un débit de 20  $\mu$ l/min sur les différentes pistes (piste QD-micelles, piste QD-ONA et pistes nues). Ces ligands possédaient des séquences totalement ou partiellement complémentaires des séquences cibles en surface des QDs.

Nous avons aussi utilisé des séquences « brouillées » (scramble) qui ne peuvent pas s'hybrider afin d'évaluer la spécificité de reconnaissance.

Pour déterminer les paramètres cinétiques : constantes de vitesse d'association et de dissociation ( $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) nous avons utilisé une méthode de la titration. Généralement, pour obtenir ces paramètres, plusieurs cycles d'expériences (association-dissociation-régénération) à des concentrations différentes en analytes sont réalisés ce qui est relativement long. La méthode de titration consiste à injecter différentes concentrations d'analytes successivement sans étape de régénération entre les cycles. Cette méthode, aussi efficace que la 1<sup>ère</sup> est plus rapide et est notamment utile quand les surfaces sont difficiles à régénérer. Elle évite la perte de cible qui peut se produire lorsque le régénérant est trop fort et permet de faire des expériences reproductibles.

Dans un premier temps, les séquences ont été injectées à 0,5 et 1  $\mu$ M dans le tampon de course. Cette étape préliminaire nous a permis d'avoir une première idée sur l'affinité de ces molécules pour chaque cible et ainsi de déterminer la gamme de concentration à utiliser pour les expériences de titration. Après les trois injections successives de ligands, la régénération des surfaces a été réalisée avec deux impulsions d'une solution de soude 10 mM, suivies d'une impulsion de tampon pendant 1 min.

Les expériences ont été réalisées au moins en trois exemplaires, à 25° C dans le tampon de course.

Toutes les données ont été doublement corrigées pour supprimer les contributions du tampon et des pistes sur le signal. Les constantes d'association et de dissociation, ont été déterminées par le logiciel BiaEval 4,1 (Biacore) en supposant un mécanisme simple réversible.

### **3. Résultats et discussion**

A partir des ONA et des QD-micelles, différentes plateformes ont été préparées et analysées par SPR. Elles sont regroupées dans le [Tableau III.4](#). Toutes les mises au point ont été faites à partir des plateformes QD-DOPC et les meilleures conditions ont été appliquées aux plateformes QD-PUPC et QD-PUPC/PUOH.

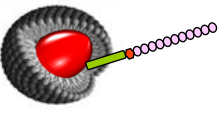
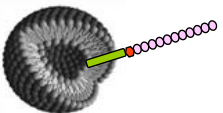
Plateformes		
<i>QD-DOPC-model-diC15-1</i>	✓	
<i>QD-DOPC-model-Chol</i>	✓	
<i>QD-DOPC-model-C18</i>	✓	
<i>QD-DOPC-antimiR21-diC15-1</i>	✓	
<i>QD-DOPC-antimiR21-diC15-2</i>	✓	
<i>QD-DOPC-antimiR21-Chol</i>	✓	
<i>QD-DOPC-antimiR21-C18</i>	✓	
<i>QD-PUPC-antimiR21-diC15-2</i>	-	
<i>QD-PUPC/PUOH-antimiR21-diC15-2</i>	-	

Tableau III.4 : Récapitulatif des différentes plateformes préparées (plateformes QDs et plateformes liposomes correspondantes).

Des plateformes à base de liposomes correspondant aux plateformes QD obtenues ont également été préparées et ont été analysées par SPR, en parallèle, pour évaluer l'impact du QD.

#### - **Influence des ONA**

Dans un premier temps nous allons discuter des paramètres dépendants des molécules ancrées, c'est-à-dire des ONA qui ont influencé l'interaction à la surface des QDs.

##### ➤ Partie hydrophobe des ONA

L'étude comparative des chaînes hydrophobes sur les ONA modèle et anti-miR-21 a montré que le fait d'avoir deux chaînes lipidiques (motif diC15) était essentiel à l'observation d'un signal d'interaction en SPR. Les QD-DOPC fonctionnalisés avec les ONA-Chol ou C18, quelle que soit la longueur de l'oligonucléotide (14 nt pour le modèle et 23 nt pour l'anti-miR-21) n'ont donné aucun signal. L'hydrophobie de ces deux lipides (chol et C18) ne semble pas suffisante pour maintenir les duplexes oligonucléotidiques formés à la surface des QDs. Seul le motif diC15 a permis un ancrage suffisamment stable à la surface des QDs. Les constantes d'affinité calculées sont présentées dans le [Tableau III.5](#).

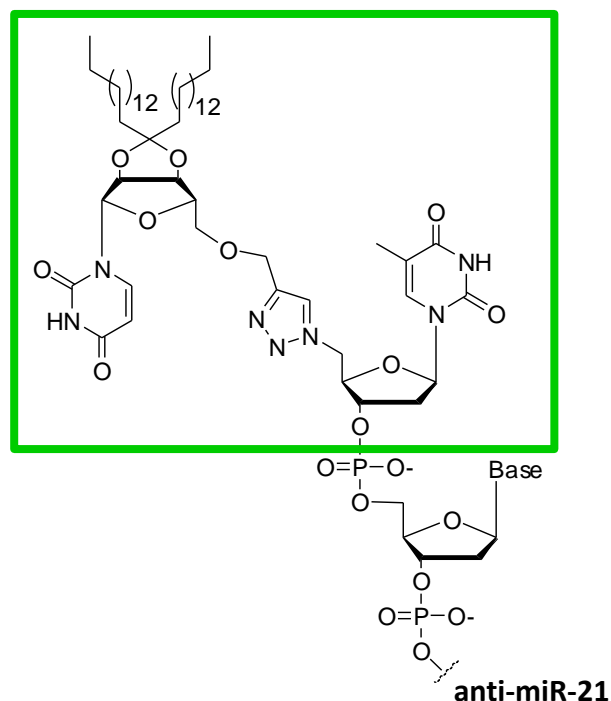
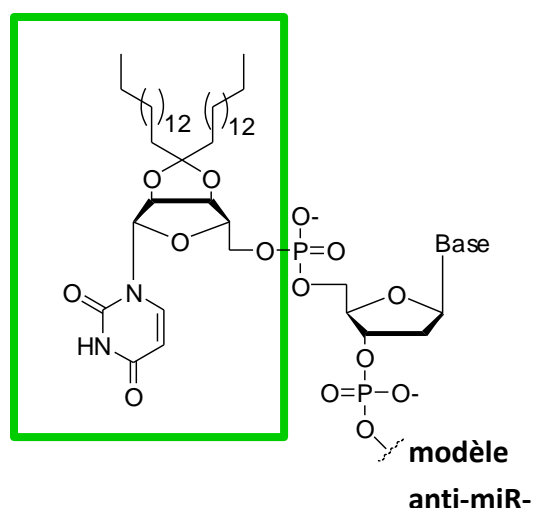


Des résultats similaires ont été observés avec les plateformes liposomes correspondantes.

Plateforme	ONA	Kd nM
Liposome DOPC	model-diC15-2	0,43±0,1
QD DOPC	model-diC15-2	0,386±0,2
QD DOPC	antimiR21-diC15-2	5,04±0,7
QD DOPC	antimiR21-diC15-1	2,96±1,8

Tableau III.5 : Constantes d'affinité obtenues avec différents ONA.

Il est important de noter que la nature des liens mis en œuvre pour la bioconjugaison de la partie hydrophobe, a eu un léger impact sur les valeurs de *Kd*. Ainsi, les QD-DOPC fonctionnalisés avec l'anti-miR-21-diC15-2 ont eu un *Kd* ( $5.04 \pm 0.7$ ) légèrement supérieur à celui des QDs fonctionnalisés avec l'anti-miR-21-diC15-1 ( $2.96 \pm 1.8$ ) (Tableau III.5). Cette légère différence pourrait provenir du fait que le lien issu d'une cyclo-addition 1,3-dipolaire (anti-miR-21-diC15-1) éloigne la séquence de l'enveloppe hydrophobe. Cet espace permettrait au brin complémentaire de mieux s'hybrider d'où la meilleure affinité observée. (Figure III.24).



**model-diC15-2 et antimiR-diC15-2**

**antimiR-diC15-1**

Figure III.24 : Comparaison des ONA antimiR21-diC15-1 et-2 possédant des liens oligonucléotide-lipide différents.

➤ Partie hydrophile des ONA

Nous avons ensuite évalué la spécificité de reconnaissance des oligonucléotides à la surface des QDs. L'analyse a été faite sur les QD-DOPC fonctionnalisés avec la séquence modèle diC15 (model-diC15-2). Dans cette étude, une séquence totalement complémentaire (14 nt), une séquence partiellement complémentaire (9 nt) et une séquence « brouillée » ont été utilisées comme analytes. Elles ont été injectées sur 3 pistes : l'une portant la plateforme QD-DOPC-ONA, l'autre la plateforme QD-DOPC non fonctionnalisée et la troisième ne portant aucune plateforme. De façon non surprenante, les résultats ont montré que le signal le plus important et le plus durable a été obtenu avec la séquence totalement complémentaire. Aucune interaction avec la séquence brouillée (qui est incapable de s'hybrider), même injectée à une concentration de  $1\mu\text{M}$  n'a été observée ni avec les QD-DOPC non fonctionnalisés démontrant la spécificité de reconnaissance à la surface des QDs (Figure III.25).

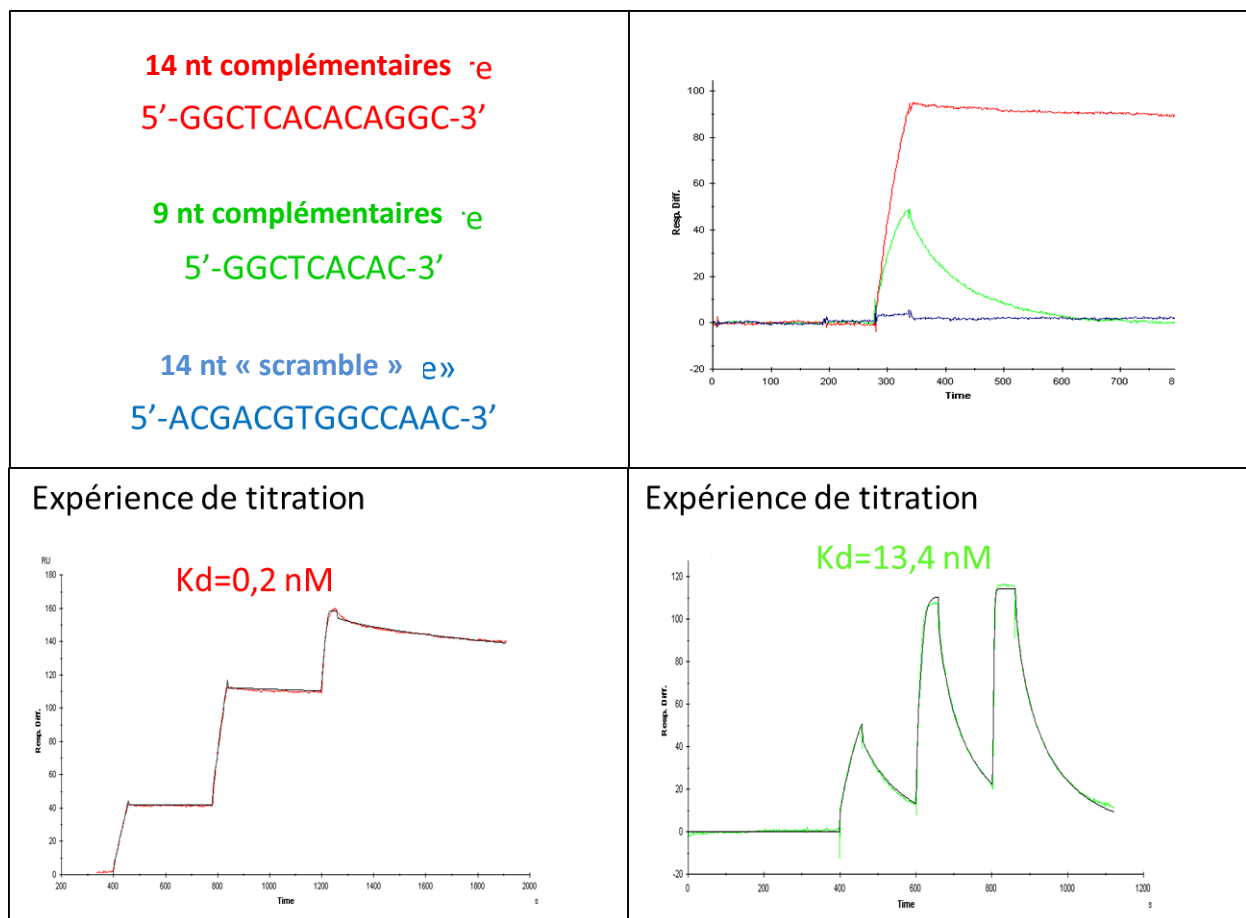


Figure III.25 : Sensorgrammes obtenus avec QD-DOPC-model-diC15-2.

- **Influence de la nanoplateforme**

Dans un deuxième temps nous allons discuter des paramètres dépendants de la plateforme qui ont influencé l'interaction à la surface des QDs.

Les plateformes liposomes et QDs ont globalement montré des profils d'interaction similaires. Cependant pour un ONA donné, une meilleure affinité à la surface des QDs est généralement obtenue. Par exemple, la plateforme QD-DOPC-antimiR21-diC15-2 a un  $Kd$  de  $5.04 \pm 0.7$  nM alors que la plateforme liposome correspondante a un  $Kd$  de  $8.59 \pm 0.8$  nM (Tableau III.6). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la plateforme QD a certainement une structure moins « dynamique » que celle des liposomes qui peuvent subir des échanges de lipides. Ce phénomène doit être plus délicat avec les QDs puisque la première couche de molécules amphiphiles (TOP ou TOPO) est stable.

Concernant la comparaison plateforme QD-DOPC/plateforme QD-nucléolipides (PUPC et PUPC/PUOH), il est intéressant de remarquer que l'utilisation de nucléolipides a conduit à une amélioration du  $Kd$  pour un oligonucléotide donné dans le cas de PUPC. Ainsi la plateforme QD-DOPC-antimiR21-diC15-2 a un  $Kd$  de  $5.04 \pm 0.7$  nM alors que la plateforme QD-PUPC correspondante a un  $Kd$  de  $2.11 \pm 0.1$  nM (Tableau III.6).

Ces variations d'affinité à la surface des QDs sont certainement liées au fait que les ONA synthétisés, une fois ancrés dans une membrane sont très proches de la surface des QDs. Il n'y a pas de liens espaceurs. Ainsi, la moindre variation de la surface des QDs pourra avoir un impact sur l'affinité. Ces résultats confirment des travaux antérieurs menés au laboratoire qui avaient montré que les nucléolipides PUPC et PUOH conduisaient à la formation de membranes aux caractéristiques différentes de celles obtenues avec des phospholipides classiques comme le DOPC [167,168].

Ces variations de surface des QDs peuvent également expliquer le fait que la plateforme QD-PUPC présente un  $Kd$  différent de celui de la plateforme QD-PUPC/PUOH correspondante.

Plateforme	ONA	Kd nM
Liposome DOPC	antimiR21-diC15-2	8,59±0,8
QD DOPC	antimiR21-diC15-2	5,04±0,7
QD PUPC	antimiR21-diC15-2	2,11±0,1
QD PUPC/OH	antimiR21-diC15-2	12,7±4,2

Tableau III.6 : Constantes d'affinité obtenues avec différentes plateformes.

La Figure III.26 montre des sensorgrammes obtenus lors des expériences de titration, avec différentes plateformes et ONA.

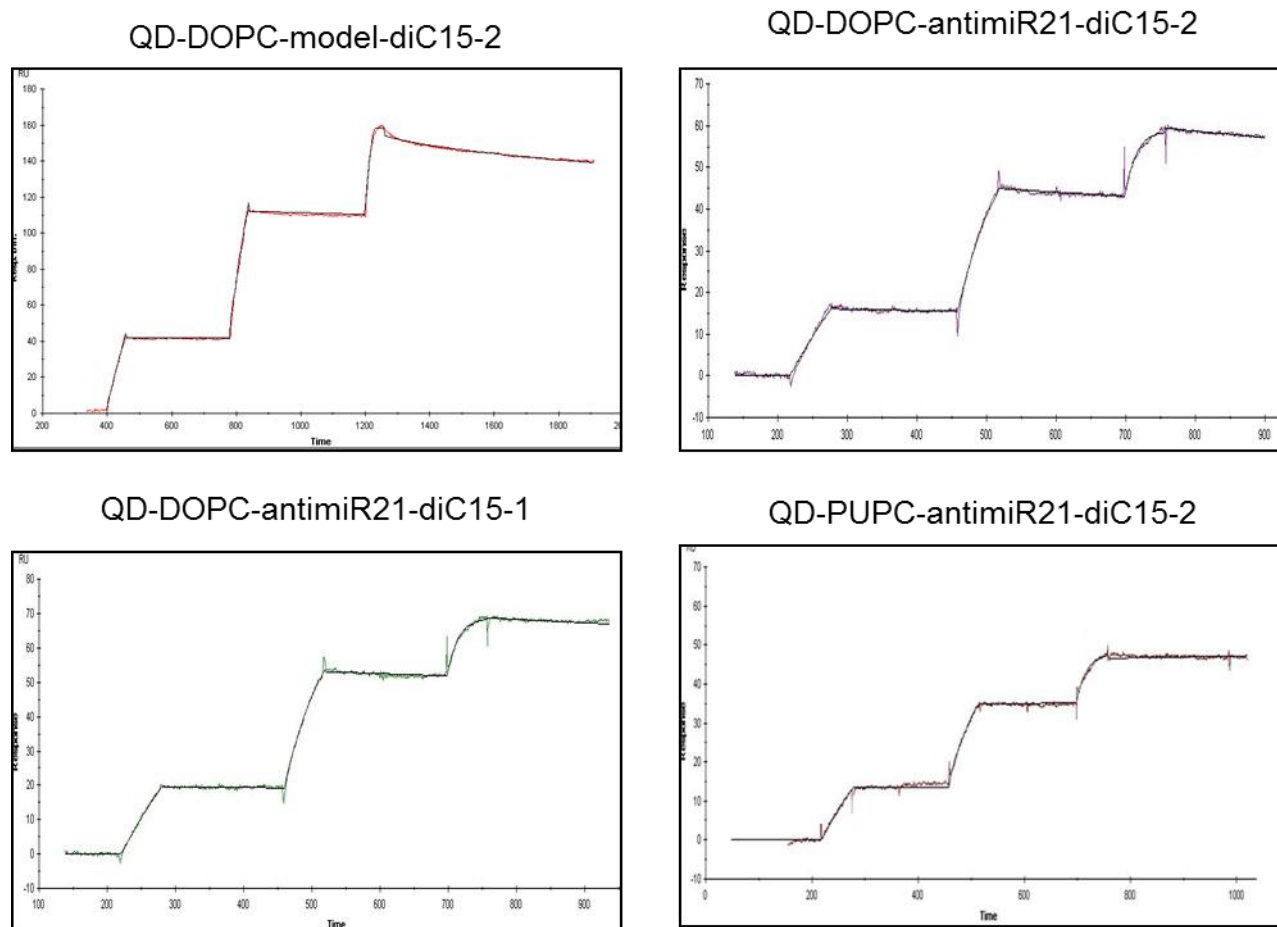


Figure III.26 : Exemples de sensorgrammes de titration obtenus.

En conclusion, cette étude d'hybridation *in vitro* par SPR à la surface des QD-ONA, nous a montré que les nanoplateformes ainsi fonctionnalisées étaient capables de s'hybrider spécifiquement avec un oligonucléotide complémentaire.

## **VI. Etude de l'hybridation *in cellulo***

Les bons résultats d'hybridation obtenus dans l'étude précédente nous ont encouragés à évaluer les plateformes QD-ONA *in cellulo*. Les plateformes utilisées dans cette partie sont celles à base de DOPC fonctionnalisées par des ONA ciblant miR-21.

### **1. Etude de pénétration cellulaire**

Dans un premier temps, nous avons regardé les capacités d'internalisation de ces nanoplateformes dans des cellules HeLa.

Pour cela, les cellules HeLa ont été incubées pendant 4 heures avec les plateformes QD-DOPC fonctionnalisées (QD-DOPC-antimiR21-diC15-2) ou non. La concentration finale en QDs était de 5 nM ce qui correspondait à une concentration finale en oligonucléotides de 100 nM pour la plateforme QD-ONA. Pour une meilleure visualisation, les noyaux ont été colorés en bleu (Hoeschst) et les membranes en vert (alexa fluor 488).

Les cellules ont été observées par microscopie à épifluorescence et « Scanning fluorescence microscopy » (Figure III.27). Les QDs étaient visibles, répartis dans le cytoplasme, à proximité immédiate des noyaux cellulaires. Les QDs semblaient relativement agrégés dans les cellules. L'analyse par « Scanning fluorescence microscopy » a confirmé la présence des QDs à l'intérieur de la cellule. Ces expériences ont montré que les nanoplateformes à base de QD fonctionnalisées ou non étaient capables d'être internalisées dans les cellules et ce sans utilisation d'agents de transfection (Figure III.27).

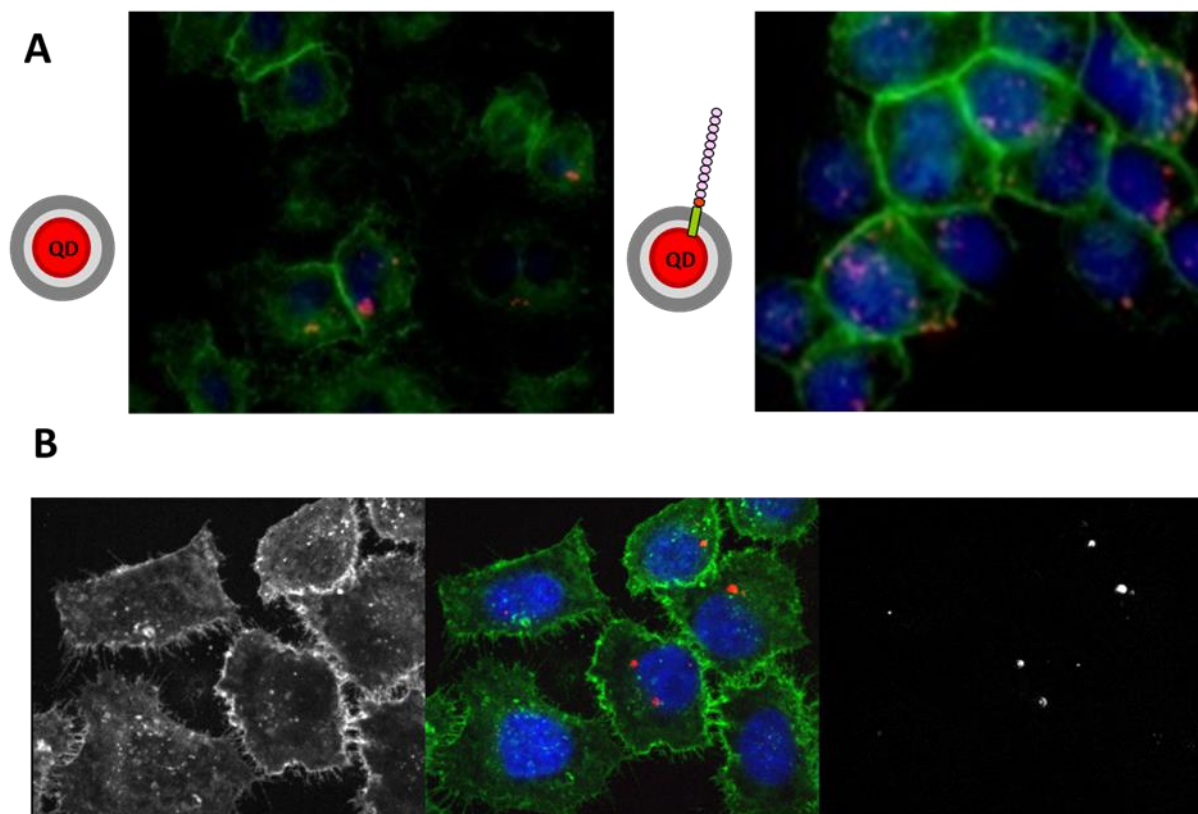


Figure III.27 : Internalisation cellulaire des plateformes QD-DOPC et QD-DOPC-antimiR21-diC15-2 dans des cellules HeLa. (A) microscopie à épifluorescence (B) « Scanning fluorescence microscopy » de la plateforme QD-DOPC-antimiR21-diC15-2

Pour tenter d'évaluer l'évolution de la plateforme dans la cellule en particulier la stabilité de l'ancrage des ONA à la surface des QDs, nous avons réalisé des expériences de co-localisation des QD avec des ONA fluorescents. Pour ce faire nous avons synthétisé un ONA antimiR21-diC15-2 possédant une sonde fluorescente, la fluorescéine (6FAM) à l'extrémité 3'. Les QD-DOPC ont été fonctionnalisés avec ces oligonucléotides amphiphiles fluorescents et incubés avec les cellules HeLa. Après un temps d'incubation de 24 heures, la co-localisation de la fluorescéine et des QDs a été analysée par « Scanning fluorescence microscopy » (Figure III.28). Cependant la taille des nanoplateformes était inférieure à la limite de résolution du microscope et l'état agrégé des QDs n'a pas facilité l'observation.

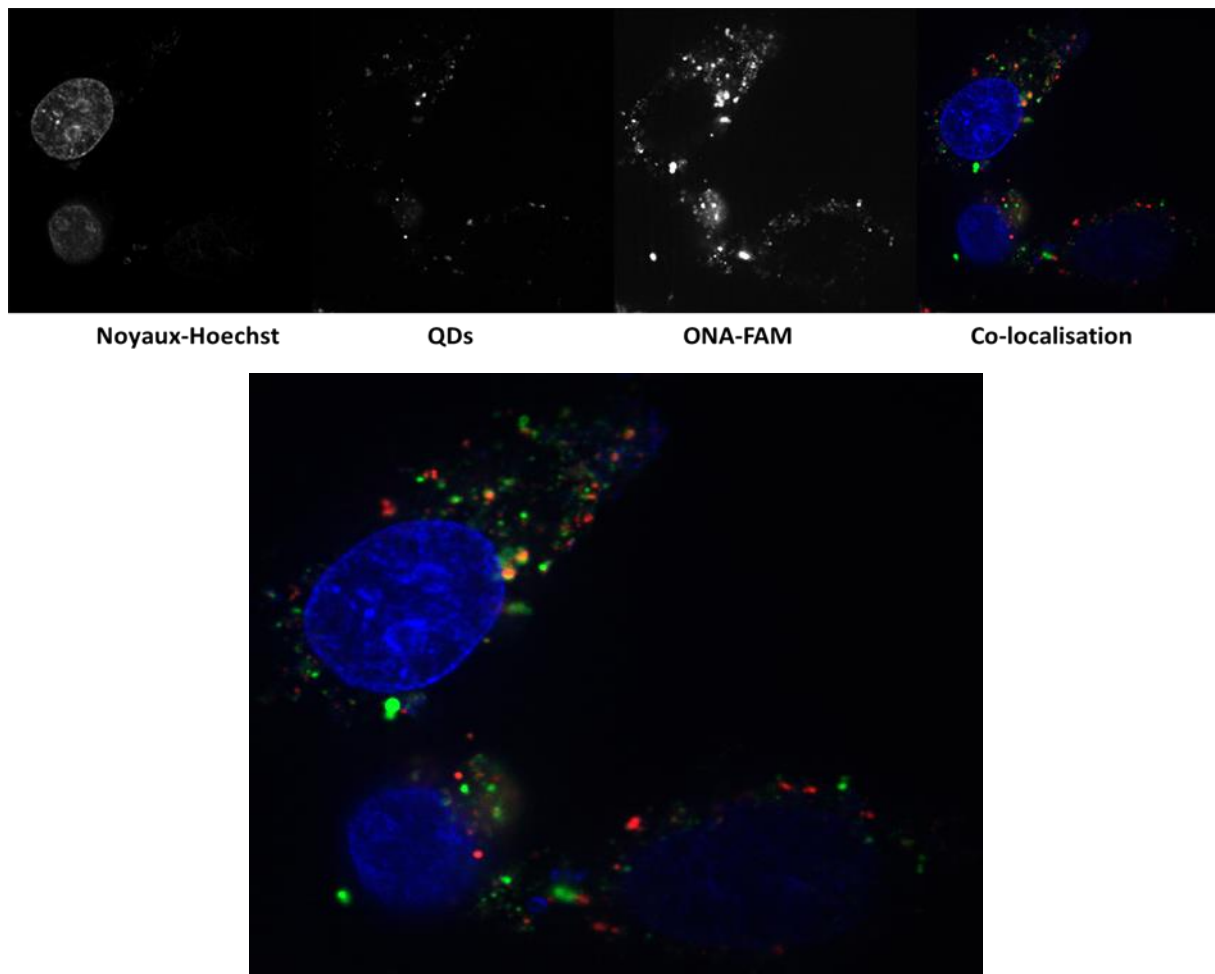


Figure III.28 : Etude de co-localisation QD/ONA-FAM.

Cette dernière étude n'a pas permis de conclure quant à la stabilité de la plateforme QD-ONA dans la cellule.

## 2. Etude d'hybridation *in cellulo*

Après avoir évalué l'hybridation *in vitro* par SPR puis la pénétration cellulaire des nanoplateformes QD-ONA par microscopie à fluorescence, l'objectif a été de tester leur capacité à s'hybrider de manière spécifique avec miR-21, *in cellulo*. Pour réaliser cette évaluation biologique, nous avons choisi la technique de RT-qPCR qui nous a permis de doser les quantités de miR-21 présent dans les cellules après incubation de la nanoplateforme.

### 2.1. RT-qPCR

La quantification des miARNs à l'aide du kit TaqMan MiRNA Assays est réalisée en 2 étapes :

- une première étape de rétro-transcription (RT). A partir des ARN totaux extraits, l'ADNc est transcrit en utilisant des amorces spécifiques
- dans la 2<sup>ème</sup> étape de PCR, les ADNc sont amplifiés en utilisant des amorces spécifiques (Figure III.29).

Les amorces TaqMan contiennent:

- un fluorophore FAM à l'extrémité 5' de l'amorce
- un petit sillon (MGB) à l'extrémité 3' de la sonde. Cette modification augmente la température de fusion (T<sub>m</sub>) sans augmenter la longueur de sonde, ce qui permet de concevoir des sondes plus courtes.
- un quencheur de fluorescence (CNC) à l'extrémité 3' de l'amorce

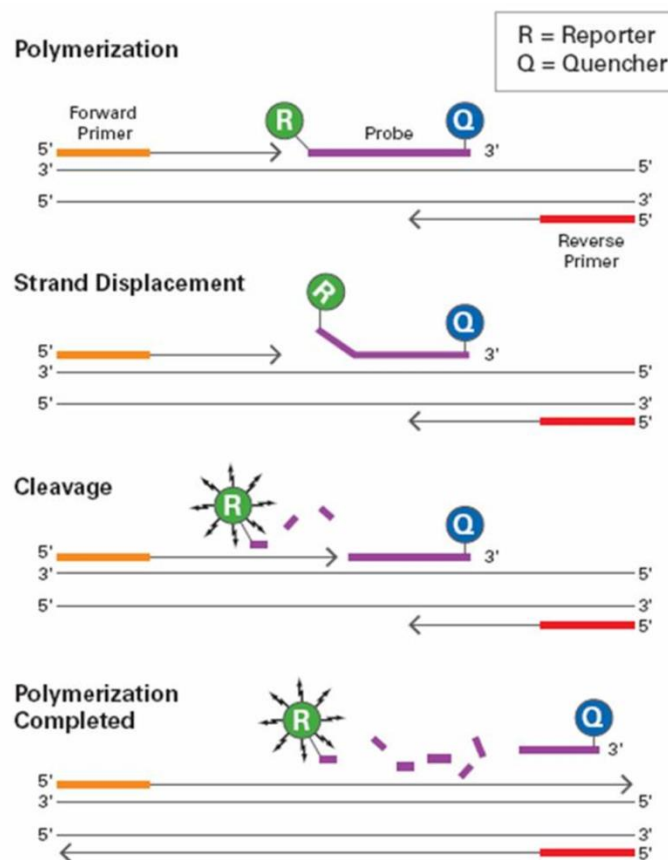


Figure III.29 : Principe de la RTqPCR Taqman.

## 2.2. Réalisation des expériences

Un certain nombre de contrôles ont été effectués. Comme pour les tests de pénétration cellulaire, les cellules HeLa ont été sélectionnées car elles expriment miR-21 en grande quantité. Globalement les oligonucléotides testés dans ces expériences ont été utilisés à une concentration de 100 nM.

Certaines molécules ont été transfectées par un agent de transfection, la lipofectamine. Il s'agissait :



- d'un oligonucléotide anti-miR-21 commercial servant de contrôle positif
- d'une séquence « brouillée » de miR-21 servant de contrôle négatif
- des ONA anti-miR-21 (antimiR21-diC15-1 et antimiR21-diC15-2).

Les plateformes et les ONA ont été testés sans agents de transfection toujours à une concentration de 100 nM en oligonucléotides (ce qui correspond à une concentration de 5 nM en QD). Il s'agissait :

- des ONA anti-miR-21 (antimiR21-diC15-1 et antimiR21-diC15-2)
- des QD-DOPC fonctionnalisés avec les ONA anti-miR-21 (antimiR21-diC15-1 et antimiR21-diC15-2)
- des QD-DOPC non fonctionnalisés.

Après une incubation de 72 heures, les ARN totaux ont été extraits.

L'expression de miR-21 dans les cellules étudiées a été déterminée par RT-qPCR via les kits TaqMan (Applied Biosystems). Pour chaque point, les cellules ont été transfectées 3 fois et pour chaque transfection, les expériences de RT-qPCR ont été réalisées en triplicate.

Concernant l'analyse, la variation de la quantité de miARN a été déterminée par la méthode de  $\Delta\Delta Ct$ , en fixant le seuil à 0,03. Cette méthode ne permet pas de déterminer le nombre de copies, mais de voir un changement par rapport à la condition de contrôle (snARN\_U6).

### 3. Résultats et discussion

Dans ces conditions, les résultats ont clairement montré que les ONAs seuls et non transfectés par la lipofectamine n'ont pas pu s'hybrider avec la cible miR-21 (Figure III.30).

En revanche, quand les ONA (antimiR21-diC15-1 et antimiR21-diC15-2) ont été transfectés à l'aide de la lipofectamine, une diminution de l'expression de miR-21 a été observée indiquant que les ONA ont pu inhiber miR-21 (Figure III.30).

Cette première expérience a permis de dire que la présence de la chaîne hydrophobe des ONA (diC15) ne représentait pas un obstacle pour l'hybridation avec la cible miARN dans la cellule. L'inhibition de l'expression de miR-21 observée dans ce cas a été quasi similaire à l'inhibition induite par l'anti-miR-21 non conjugué (Figure III.30).

Par contre ces résultats ont montré que les ONA anti-miR-21, en absence de lipofectamine, n'étaient pas actifs. Ils n'arrivent probablement pas à atteindre leur cible dans la cellule. Nous verrons ultérieurement (Cf chapitre IV) que les ONA sont capables d'être internalisés facilement dans des cellules, sans agent de transfection, mais qu'ils restent très certainement piégés dans des endosomes (Figure III.30).

L'incubation des cellules avec les nanoplateformes QD-ONA a conduit à l'inhibition de l'expression de miR-21, prouvant ainsi qu'elles étaient capables de s'hybrider avec miR-21 dans la cellule. Cette observation a été faite avec les deux ONA anti-miR-21 (antimiR21-diC15-1 et antimiR21-diC15-2). Ce résultat suggère que contrairement aux ONA seuls, les nanoplateformes QD sont capables non seulement de pénétrer dans les cellules mais aussi d'atteindre leur cible, et ce, sans utilisation d'agent de transfection.

Les QD-DOPC non fonctionnalisés, ainsi que la séquence « brouillée » n'ont eu aucun effet sur l'expression de miR-21 dans les cellules HeLa montrant la spécificité d'action des plateformes QD-ONA testées.

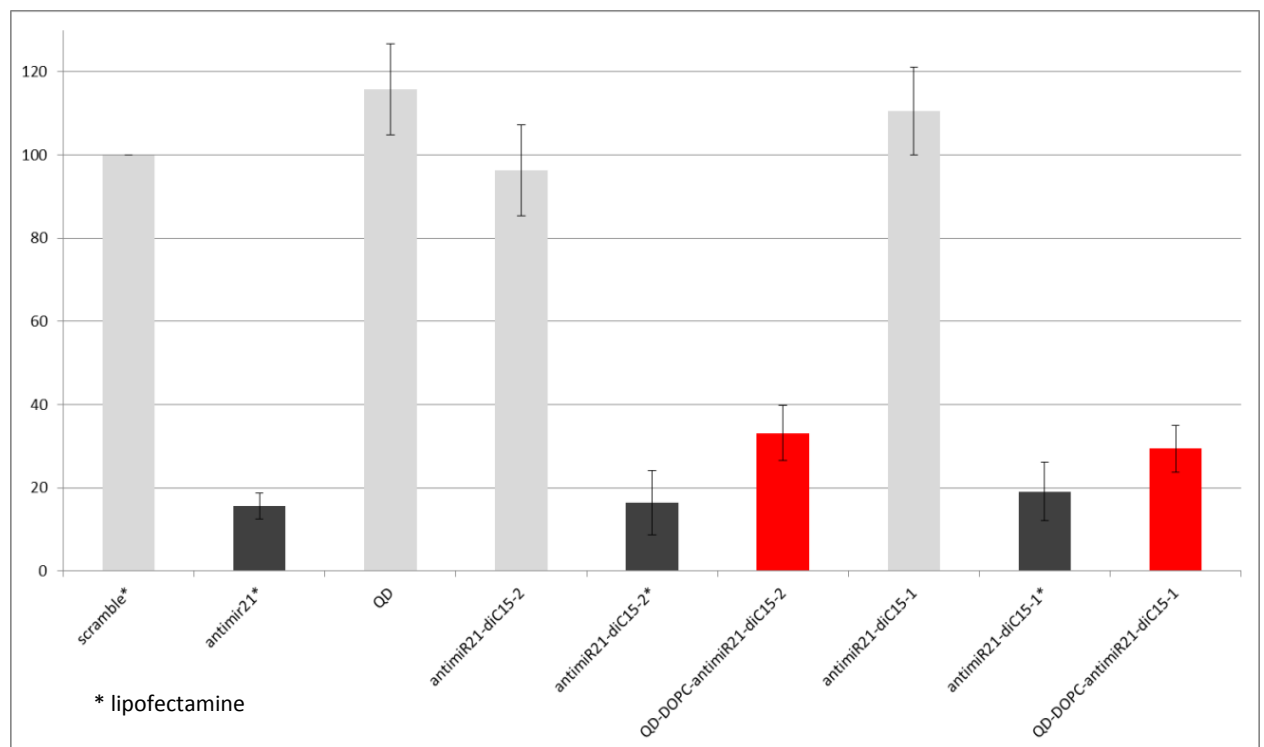


Figure III.30 : Dosage de miR-21 dans les cellules HeLa par RT-qPCR

En conclusion de cette partie, nous pouvons dire que les plateformes QD-ONA fonctionnalisées avec la séquence anti-miR-21 sont capables d'être internalisées dans les cellules et d'interagir de manière spécifique avec leur cible cellulaire miR-21.

## VII. Conclusion et perspectives

L'objectif de cette partie était de développer une nanoplateforme de détection et d'imagerie de miARN qui soit rapide, sensible et pouvant être utilisée sur cellules vivantes. Notre stratégie était basée sur l'utilisation de

QDs comme sonde fluorescente. Ce sont des nanocristaux aux propriétés de fluorescence remarquables par rapport aux fluorophores organiques classiques.

La nanoplateforme possède en son cœur les nanocristaux de QDs et en surface des oligonucléotides anti-miARN pour la détection et l'imagerie du miARN cible. Le miARN sélectionné dans cette étude, est miR-21, largement surexprimé dans de nombreux types de cancer.

Les oligonucléotides anti-miARNs utilisés dans cette étude sont des ONA qui doivent se fixer à la surface des QDs par ancrage hydrophobe. Pour favoriser cet ancrage, nous avons choisi des QDs du type cœur coquille CdSe/ZnS entourés de ligands hydrophobes (TOP, TOPO) qui ont été entourés de molécules amphiphiles (DOPC ou nucléolipides) par formation de micelles.

Différentes plateformes ont été préparées se différenciant par la partie hydrophobe des ONA et par les molécules amphiphiles utilisées pour la formation des QD-micelles. L'affinité et la spécificité des ONA en surface des QDs ont été évaluées à l'aide de la SPR. Cette méthode nous a permis de suivre en temps réel l'interaction entre les ONA anti-miR-21 et le miARN cible et d'obtenir des constantes d'affinité.

Après la démonstration de l'hybridation *in vitro*, nous avons testé la capacité de la plateforme QD-ONA à pénétrer dans les cellules et à s'hybrider de manière spécifique à la cible miR-21. La figure suivante résume les différentes étapes qui ont conduit à l'obtention de cette nanoplateforme (Figure III.31).

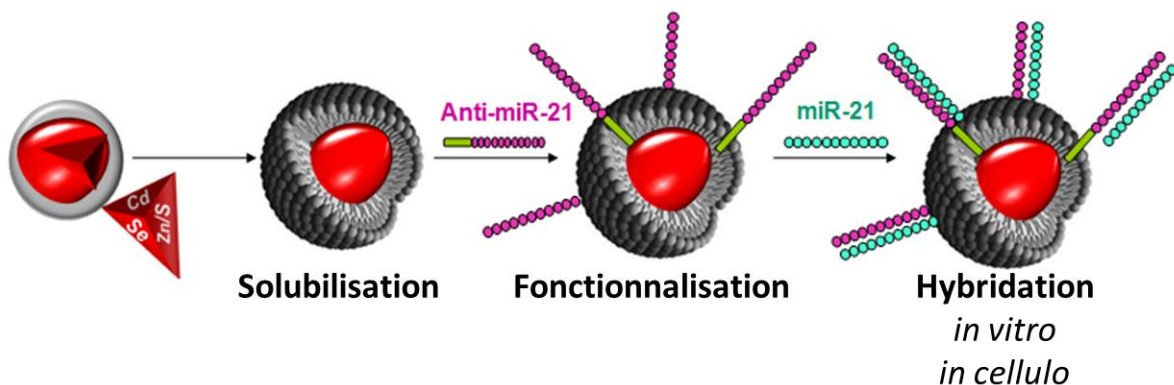


Figure III.31 : Mise en place et évaluation de le nanoplateforme à base de QD.

Ce travail a montré la potentialité de la nanoplateforme mise en place. Cependant pour une détection et un suivi de miARN, il faudrait la faire évoluer vers un système de balise moléculaire fonctionnant selon un système ON/OFF. Il faudrait pour cela fixer sur les ONA un quencheur. Ainsi, en absence de la cible, le QD serait éteint en raison de la proximité du quencheur. Par contre, en présence de la cible, il y aurait hybridation entraînant un éloignement du quencheur et le QD redeviendrait fluorescent (Figure III.32).

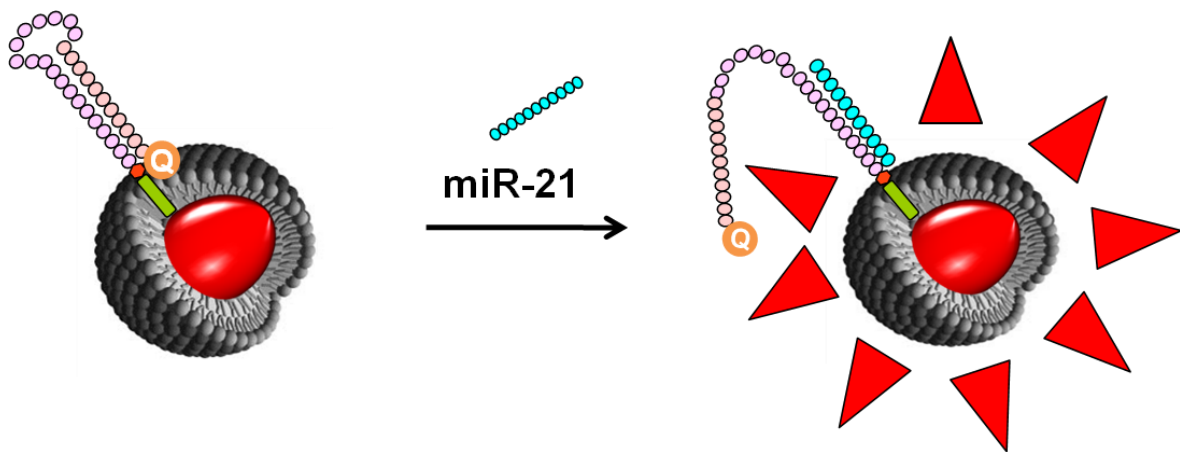


Figure III.32 : Perspectives



PARTIE IV :  
PLATEFORME HSA A VISEE  
THERAPEUTIQUE

---

## I. Présentation générale de la plateforme

L'objectif de cette partie est de développer des molécules capables de contrôler les taux de miARN dérégulés dans les cellules cancéreuses. Ces molécules sont des analogues de miARN développés dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements contre le carcinome hépatocellulaire (CHC).

Nos molécules sont des oligonucléotides, qui de par leur nature, sont des molécules fragiles et incapables de franchir les membranaires cellulaires pour aller agir sur leurs cibles. Dans le but d'améliorer leurs performances en termes de résistance enzymatique, de pénétration cellulaire et de transport dans l'organisme, nous avons envisagé la mise en place d'une plateforme à base Sérum albumine humaine (SAH). Cette protéine permet un ciblage tumoral *via* son affinité pour la protéine SPARC (Secreted protein, acidic and rich in cysteine) spécifiquement sécrétée par les tumeurs solides. Nos analogues de miARN, devenus amphiphiles par leur bioconjugaison avec des molécules lipidiques, doivent être chargés sur la SAH, *via* des sites de liaison aux acides gras présents sur cette dernière. La [Figure IV.1](#) est une présentation générale de la nanoplateforme à base de SAH.

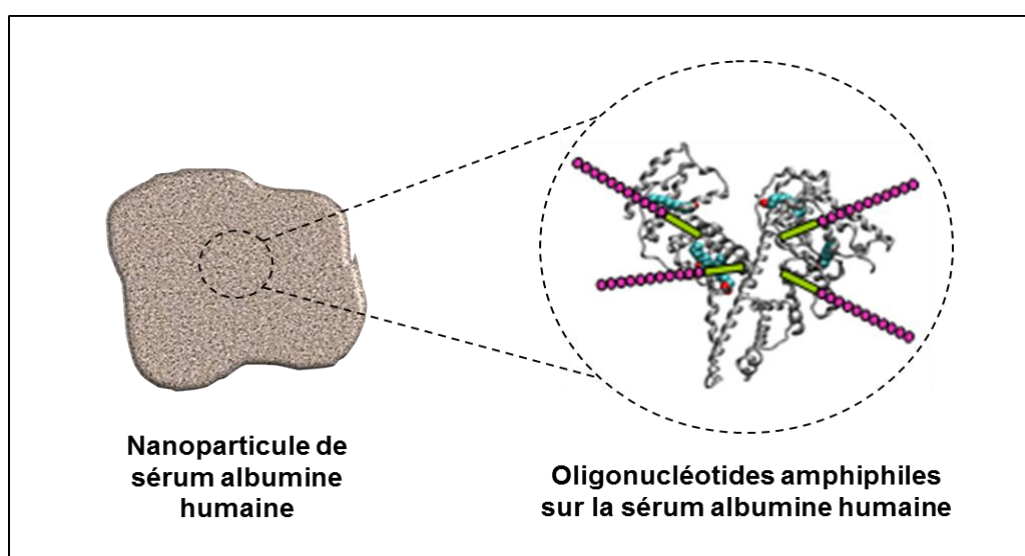


Figure IV.1 : Présentation générale de la plateforme à base de Sérum Albumine Humaine (SAH).

## II. Sérum Albumine Humaine

### 1. Généralités sur la SAH

La sérum albumine humaine (SAH) est la protéine la plus abondante dans le plasma avec une concentration sanguine de 5 g/100 ml. Ses rôles

physiologiques majeurs sont de transporter les solutés dans le sang et vers les organes cibles, ainsi que de maintenir le pH et la pression osmotique du plasma [167]. Parallèlement à ses applications cliniques ordinaires, tel que le traitement de choc hypovolémique, de nombreux chercheurs ont tenté d'utiliser la SAH comme support pour délivrer des molécules thérapeutiques.

La SAH est surtout connue pour son extraordinaire capacité de liaison de ligands, fournissant un espace de chargement pour une grande variété de composés (des métaux tels que  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , des acides gras, des acides aminés, des métabolites telle que la bilirubine et de nombreux composés médicamenteux). Ceci leur permet d'être disponibles en quantités bien supérieures à celles permises par leur solubilité dans le plasma.

La SAH possède également des propriétés anti-oxydantes, soit directement, soit par la liaison et le transport de piègeurs de radicaux libres, ou par la séquestration de métaux de transition pro-oxydants.

## **2. Caractéristiques structurales**

La séquence primaire de la SAH montre que cette protéine est un polypeptide de 585 résidus contenant 17 ponts disulfures et une cystéine libre. A partir de l'analyse de sa structure primaire, la SAH semble être formée par trois domaines homologues (appelé I, II, et III). Chaque domaine est connu pour être constitué par deux sous-domaines, appelés A et B (Figure IV.2(A))

La première structure cristalline de la SAH à basse résolution a été reportée par Carter et ses collègues en 1989, et sa structure raffinée à 2,8 Å de résolution a été publiée ultérieurement par le même groupe [168].

Récemment, la co-cristallisation de la SAH avec des molécules liées a permis de fournir de nouvelles données cristallographiques. Ainsi une structure comportant cinq myristates [169] fixés au niveau des sites de liaison des acides gras a été publiée (Figure IV.1(B)) et très récemment de nouvelles données impliquant des dérivés perfluorocanes [170] ont été reportées.

Ces études donnent un éclairage sur les caractéristiques structurales de la protéine et contribuent à comprendre comment elle lie les différentes molécules transportées.



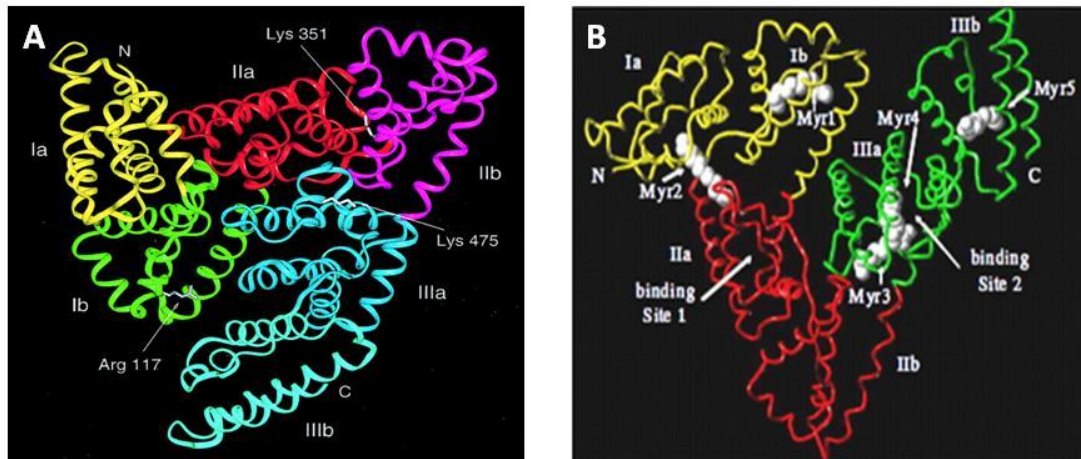


Figure IV.2 : Structure de la SAH **(A)** seule avec les différents sous-domaines et les extrémités N et C terminales **(B)** en présence des restes myristates.

### 3. Applications biomédicales de la SAH

#### 3.1. La SAH : un vecteur de médicaments

La SAH est en train de devenir l'un des transporteurs les plus importants, de peptides actifs, de petites molécules, d'anticorps à visée thérapeutique, en particulier pour le traitement et le diagnostic de tumeurs malignes, de maladies métaboliques inflammatoires et virales.

Les succès scientifiques et commerciaux d'Abbraxane® pour le traitement du cancer du sein, du Levemir® (peptide d'insuline) et du Victoza® (peptide glucagon) pour le traitement du diabète, ont ouvert la voie au développement de diverses stratégies de liaison à l'albumine pour l'amélioration du profil pharmacocinétique de molécules thérapeutiques.

La SAH est également utilisée dans le développement de particules contenant des agents de contrastes comme le <sup>99m</sup>Tc. Elles sont injectées en sous-cutané à proximité ou directement dans le site de la tumeur et sont utiles pour la lymphoscintigraphie et la détection de métastases ganglionnaires. Dans le même contexte, l'administration par voie intraveineuse de SAH marquée par la fluorescéine (AFL-HSA) a été évaluée avec succès dans les glioblastomes de stade I et II, lors de l'exérèse tumorale facilitant la distinction des tissus malins et des tissus sains [171].

Les molécules transportées sont généralement chargées par les sites de liaison présents sur la SAH ou par l'intermédiaire d'anticorps et de peptides possédant une forte affinité pour la protéine (de l'ordre du nano, du pico, voire du femto molaire) et éventuellement par formation de liaisons covalentes. Des nanoparticules ainsi que des structures micellaires contenant des médicaments lipophiles, à base de SAH peuvent aussi être formulées (Figure IV.3) [172].

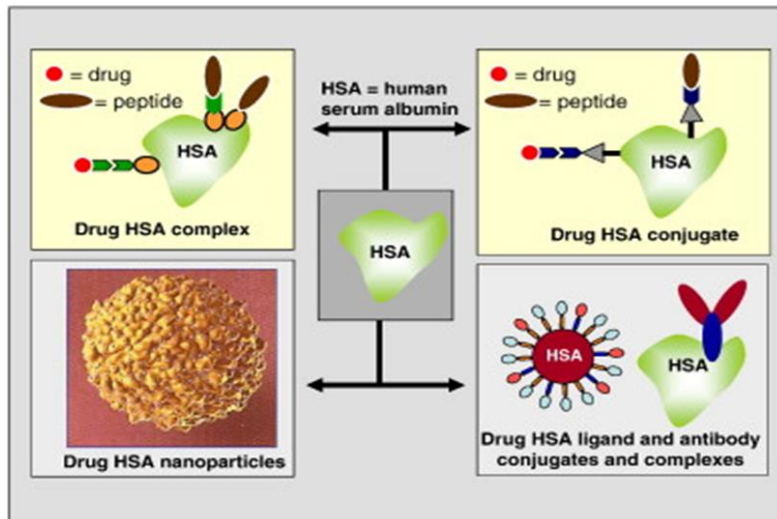


Figure IV.3 : La SAH, un vecteur de médicament polyvalent.

### 3.2. Exemple de l'Abraxane®

L'Abraxane® est une nanoparticule à base de SAH complexée avec du paclitaxel, développée par American Bioscience dans le traitement du cancer du sein [173]. Sa préparation repose sur l'injection à haute pression des deux partenaires (SAH et paclitaxel hydrophobe) pour former des nanoparticules d'une taille moyenne de 130 nm. Contrairement au paclitaxel seul, la nanoparticule résultante est soluble dans l'eau et a été approuvée en 2005 pour le traitement du cancer du sein.

L'un des aspects les plus intéressants d'Abraxane® est que, bien qu'il soit stable sous forme de nanoparticules dans sa formulation galénique, il se dissout rapidement après perfusion intraveineuse. Ceci entraînant la libération de complexes SAH-paclitaxel ayant une taille comparable à celle de la SAH endogène.

Les complexes SAH-paclitaxel s'accumulent dans la tumeur en profitant de l'effet de perméation bien connu de la néovascularisation angiogénique autour des tumeurs solides. Mais cette accumulation est surtout le fait d'une voie de transport médiée par la glycoprotéine GP60 située sur la surface de la cellule endothéliale. Elle semble être responsable de la captation tumorale des complexes SAH-paclitaxel ainsi que de la libération consécutive du paclitaxel au niveau de la tumeur. En effet, les complexes SAH-paclitaxel se lient à la GP60 avec une forte affinité de l'ordre du nanomolaire, entraînant le phénomène de transcytose [174], ce qui permet la délivrance du paclitaxel dans l'espace interstitiel tumoral.

A cet endroit l'accumulation de la SAH est probablement facilitée par la présence de la protéine SPARC (protéine sécrétée, acide et Riche en cystéine), une glycoprotéine sécrétée spécifiquement par les cellules de tumeurs solides dans la matrice cellulaire et qui possède une haute affinité pour la SAH. La liaison du complexe SAH-paclitaxel à SPARC pourrait induire une modification conformationnelle de la SAH, favorisant la libération du paclitaxel à proximité de la tumeur (Figure IV.4).

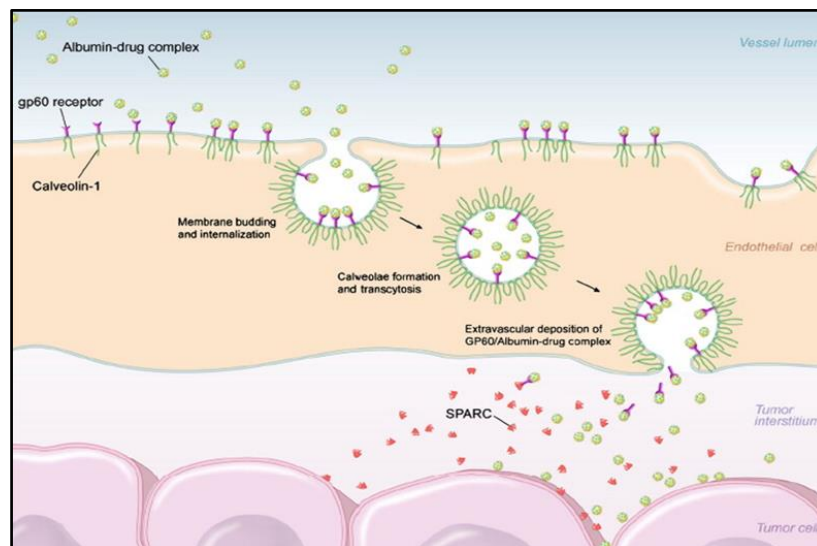


Figure IV.4 : Absorption de complexes de SAH-paclitaxel par voie de transcytose et interaction avec SPARC dans la matrice extracellulaire des tumeurs.

### 3.3. Intérêt potentiel dans le CHC

A l'heure actuelle, le système de ciblage hépatique le plus courant repose sur l'utilisation de groupes galactoses capables de se lier aux récepteurs aux asialo-glycoprotéines présents à la surface des hépatocytes. Ce système couramment utilisé a montré son efficacité et présente l'intérêt de ne pas être toxique. Néanmoins le ciblage concerne tous les hépatocytes et non uniquement les cellules cancéreuses. Des travaux très récents ont reporté le développement d'un aptamère capable de reconnaître des cellules cancéreuses hépatiques LH86 [175].

L'exploitation des propriétés naturelles de la SAH représente une stratégie de vectorisation intéressante des cellules tumorales. Et l'accumulation de la SAH dans les tumeurs solides et sa fixation sur la protéine SPARC, spécifiquement sécrétée par ces tumeurs rationalisent le développement de systèmes de vectorisation basés sur la SAH. Ce système pourrait s'avérer être très prometteur dans le cadre du CHC puisque différents travaux dont certains émanent du Laboratoire de Christophe Grosset ont montré une sur-expression de la protéine SPARC dans le CHC [176-177].

### III. miARN cible

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), un cancer primitif du foie, est la 5ème cause de décès par cancer dans le monde. Dans plus de 80 % des cas, le CHC survient chez des patients atteints de pathologies hépatiques préexistantes (cirrhose, hépatite virale...). Au niveau mondial, l'incidence du CHC est en constante progression depuis 15 ans en raison de la forte prévalence de cas d'hépatite virale, de l'augmentation de l'alcoolisme et de l'obésité.

Les options de traitement du CHC comprennent la transplantation hépatique, la résection ou la radiothérapie locale, ce qui a considérablement amélioré la survie des patients. Cependant le diagnostic du CHC est souvent obtenu à des stades avancés de la maladie quand les solutions thérapeutiques sont limitées (principalement la transplantation hépatique) et les patients font le plus souvent face à une résurgence de la maladie. Avec le développement d'inhibiteurs de kinase comme le Sorafenib (inhibiteur de kinases agissant sur le récepteur de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et de la Ras-kinase), la thérapie moléculaire semble être une voie prometteuse de traitement du CHC [178]. Cependant, ces thérapies s'accompagnent souvent d'intolérances médicamenteuses chez les patients et ont des effets bénéfiques à courts termes. Ces résultats encouragent la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour proposer des traitements innovants.

Récemment, l'identification de cibles thérapeutiques potentielles dans le CHC a été faite par analyse du génome entier, *via* des systèmes de séquençage à haut débit. En voici quelques exemples : VEGFR, EGFR, DDEF1, VANGL1, WDRPUH, Ephrin-A1, gypican-3 (GPC3), (PFTK1)...

Ces protéines sont essentiellement présentes au niveau des cellules tumorales et des médicaments susceptibles de moduler leur effet par activation ou inhibition constituent des thérapies ciblées. Dans ce cadre, des anticorps monoclonaux, des acides nucléiques antisens et des petites molécules ont atteint les phases II et III des essais cliniques et leur efficacité a généralement été démontrée. Des exemples sont présentés dans le [Tableau IV.1 \[178\]](#).

Il s'agit essentiellement de thérapies ciblant les facteurs de croissance fréquemment exprimés dans les cellules du CHC (EGFR), l'angiogenèse (VEGF) ainsi que de multiples tyrosine kinases.

Drug	Type of Drugs	Molecular Targets	Affected Signaling Pathways	FDA Approval
Sorafenib	Tyrosine kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, RAF	VEGFR, PDGFR, RAS/MAPK	yes
Sunitinib	Tyrosine kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, c-kit	VEGFR, PDGFR, c-kit	No, phase II or 3 trials
Bevacizumab	Monoclonal antibodies to ligand	VEGFR	VEGFR	No, phase II or 3 trials
Cetuximab	Monoclonal antibodies to ligand	EGFR	EGFR	No, phase II or 3 trials
Erlotinib	Tyrosine kinase inhibitor	EGFR	EGFR	No, phase II or 3 trials
Gefitinib	Tyrosine kinase inhibitor	EGFR	EGFR	No, phase II or 3 trials
Lapatinib	Tyrosine kinase inhibitor	Her-2/neu	Her-2/neu	No, phase II or 3 trials
Rapamycin	ST kinase inhibitor	mTOR	PIK3/Akt/mTOR	No, phase II or 3 trials
Everolimus	ST kinase inhibitor	mTOR	PIK3/Akt/mTOR	No, phase II or 3 trials
XL-765	ST kinase inhibitor	PI3K	PIK3/Akt/mTOR	No, phase II or 3 trials
Trastuzumab	monoclonal antibodies to receptor	Her-2/neu	Her-2/neu	No, phase II or 3 trials

Tableau IV.1 : Nouvelles thérapies du CHC.

Parmi les nouvelles cibles protéiques étudiées, le glypican-3 (GPC3) est une protéine exprimée dans les hépatoblastes au cours de l'embryogenèse hépatique où elle intervient dans le contrôle de la prolifération des hépatocytes et la croissance hépatique. Après la naissance, son expression hépatique s'éteint. Dans 75% des cancers du foie, l'expression du GPC3 réapparaît dans les cellules tumorales hépatiques et plusieurs équipes ont montré qu'elle participait aux mécanismes de carcinogenèse du foie [179].

Le GPC3, de par ses propriétés inductrices de la prolifération des cellules cancéreuses constitue donc une cible thérapeutique pertinente. Ainsi, l'inhibition du GPC3 par immunothérapie a montré son efficacité sur des modèles de souris atteintes de CHC et des essais cliniques de phase I sont actuellement en cours. D'autre part, l'équipe de Christophe Grosset (GREF, INSERM 1053, Bordeaux) a montré que l'extinction du gène GPC3 par ARN interférence, *in vitro*, induisait l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose alors que sa sur-expression potentialisait la croissance cellulaire. Cette inhibition semble être due à un effet combiné associant un arrêt de certaines cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et une entrée d'autres cellules en apoptose [180].

Ils ont également montré que l'expression du GPC3 était sous contrôle post-transcriptionnel et ont identifié un certain nombre de miARN impliqués dans la régulation du GPC3. Parmi eux miR-96 et son paralogue miR-1271 i) sont capables d'inhiber la croissance des cellules de CHC et d'induire l'apoptose par une diminution de l'expression du GPC3, ii) corrèlent négativement avec l'expression du GPC3 dans certains sous-groupes de patients atteints de CHC [181,182].

Le bilan de ces résultats suggère que le GPC3 est une cible thérapeutique pertinente dans le CHC et que miR-96 aurait les qualités d'une molécule thérapeutique anticancéreuse.

C'est ce miARN que nous avons choisi de cibler dans cette partie du travail. Une chimiothèque d'ONA analogues de miR-96 a ainsi été préparée en optimisant la partie oligonucléotide puis la partie hydrophobe. Ces molécules ont ensuite été biologiquement évaluées par un criblage fonctionnel et les plus intéressantes ont été chargées sur la SAH grâce à leur partie lipidique. L'affinité des ONA sélectionnés pour la SAH a enfin été mesurée.

#### **IV. Optimisation des oligonucléotides**

##### **1. Design des analogues de miR-96**

###### **1.1. Choix de la structure de l'analogue de miARN**

Les analogues de miARN sont utilisés dans un contexte de remplacement lorsque ceux-ci se retrouvent sous-exprimés dans la cellule. Comme nous l'avons vu (Cf Chapitre I), il existe plusieurs stratégies permettant de rétablir les taux de miARN. Nous avons choisi de délivrer à la cellule des miARN sous leur forme mature, en double brin, tels qu'ils existent dans le cytoplasme. A ce stade, ils seront pris en charge par le complexe RISC et après séparation des brins guide et passager, le brin guide pourra interagir avec l'ARNm du GPC3 au niveau de la partie 3' non traduite. L'intérêt de travailler sur les miARN matures est d'éviter l'utilisation d'acteurs de la voie de maturation (Drosha ou Dicer) pour obtenir l'effet biologique. En effet, ces derniers peuvent être déficients dans certains cancers [55,56].

Dans cette forme mature en double brin, seul le brin guide est fonctionnel car il possède la séquence graine, nécessaire à la l'hybridation avec la cible ARNm. L'apport du brin guide, seul aurait pu être envisagée mais plusieurs études ont montré que la délivrance de doubles brins était fondamental pour leur reconnaissance et leur prise en charge par le complexe RISC.

Le design des analogues de miR-96 a consisté à partir de la structure naturelle de miR-96 en modifiant un certain nombre de paramètres comme :

- la séquence du brin guide afin d'améliorer l'interaction avec l'ARNm cible
- la séquence du brin passager afin de modifier la stabilité des duplexes brin guide/brin passager
- la chimie des oligonucléotides afin d'augmenter leur résistance face aux endo- et exonucléases.

## 1.2. Modifications du brin guide

La modification de la séquence du brin guide avait pour but de renforcer l'interaction avec la cible ARNm afin d'améliorer l'effet régulateur de miR-96. La Figure IV.5 montre l'interaction naturelle de ces 2 ARN.

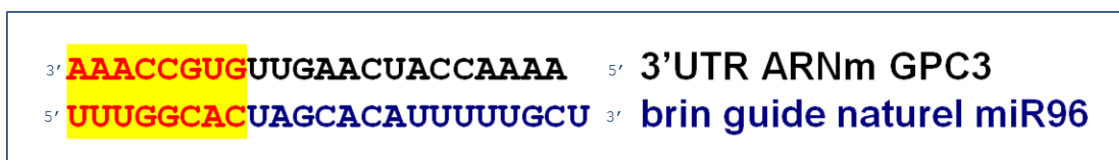


Figure IV.5 : Interaction ARNm cible (GPC3) et miR-96.

Cette interaction n'est pas parfaite, sauf au niveau de la séquence « graine » surlignée en jaune dans la Figure IV.5, c'est ce qui fait d'ailleurs sa particularité par rapport à un siARN qui possède une complémentarité parfaite avec sa cible. Les modifications de la séquence du brin guide ont consisté à substituer des bases de façon à augmenter la zone de complémentarité de la séquence graine et ainsi tenter de favoriser la formation d'un complexe miARN/ARNm plus stable susceptible d'améliorer l'effet des analogues de miR-96.

La Figure IV.6 montre les séquences des 3 brins guides, leurs zones d'appariement avec l'ARNm en jaune ainsi que leurs dénominations respectives :

- le brin guide qui possède la séquence « graine » allant des bases 1 à 8, est le brin guide naturel, il est appelé **N**
- le brin guide **A**, a une séquence « graine » allant des bases 1 à 13
- le brin guide **Z**, a une séquence « graine » allant des bases 1 à 8 et présente une autre zone de complémentarité parfaite allant des bases 18 à 22.

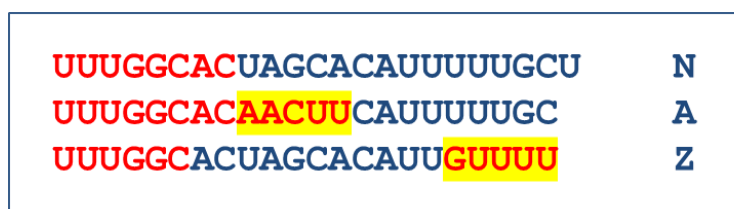


Figure IV.6 : Design des brins guides. Les zones d'appariement avec l'ARNm cible sont en rouges, les modifications par rapport au brin naturel en jaune.

### 1.3. Modification du brin passager

La séquence naturelle de miR-96 est constituée d'un duplexe dont les séquences sont partiellement complémentaires et dont les extrémités sont décalées.

Les modifications de la séquence du brin passager ont porté sur la conservation ou non des zones de mésappariements et du décalage des extrémités. La combinaison de ces 2 paramètres a permis de construire 4 séquences de brin passager (*m*, *m'*, *c*, *c'*) pour chaque brin guide décrit précédemment (N, A et Z) conduisant *in fine* à l'obtention de 12 duplexes différents présentés dans la Figure IV.7:

- le brin passager **m** possède des mésappariements et des extrémités décalées, à l'image du brin passager naturel
- le brin passager **m'** possède des mésappariements et des extrémités alignées
- le brin passager **c** est complètement complémentaire avec des extrémités décalées
- le brin passager **c'** est complètement complémentaire avec des extrémités alignées.

5' <b>UUUGGCACUAGCACAUUUUJGCU</b> 3'	guide N
3' GUAUAACCGUGA <b>CGUGUACUAA</b> 5'	passager Nm
3' UAACCGUGA <b>CGUGUACUAA</b> CGA 5'	passager Nm'
3' GUAUAACCGUGAUCGUGUAAAAA 5'	passager Nc
3' AAACCGUGAUCGUGUAAAAA 5'	passager Nc'
5' <b>UUUGGCACAACUU</b> CAUUUJGCU 3'	guide A
3' GUAUAACCGUGU <b>GAAGUACUA</b> 5'	passager Am
3' AAACCGUGU <b>GAAGUACUA</b> ACG 5'	passager Am'
3' GUAUAACCGUGUUGAAGUAAAAA 5'	passager Ac
3' AAACCGUGUUGAAGUAAAAACG 5'	passager Ac'
5' <b>UUUGGCACUAGCACAUUGUUUU</b> 3'	guide Z
3' GAUAUAACCGUGU <b>CGUGUACUA</b> 5'	passager Zm
3' AAACCGUGU <b>CGUGUACUA</b> AAAA 5'	passager Zm'
3' GAUAUAACCGUGUACGUGUAAAAA 5'	passager Zc
3' AAACCGUGUACGUGUAAACAAAA 5'	passager Zc'

Figure IV.7 : Design des brins passagers pour chaque brin guide (Brin guide : zones d'appariements avec l'ARNm cible en rouge, Brin passager : zones de mésappariements avec le brin guide en vert).



## 1.4. Modifications chimiques

En dernier lieu, des modifications chimiques ont été apportées pour conférer aux molécules synthétiques, une résistance aux nucléases. Il s'agit de modifications 2'OMe qui empêchent l'attaque nucléophile généralement observée avec le groupement hydroxyle en 2' des ARN.

Par rapport aux anti-miARN qui doivent former des duplexes très stables avec le miARN qu'ils inhibent, les duplexes constituant les analogues de miARN doivent être séparés au niveau du complexe RISC. C'est pourquoi des modifications LNA qui renforcent fortement la stabilité des duplexes n'ont pas été utilisés dans ce cas.

Les brins guides ont été synthétisés totalement en ARN ou en 2'OMe. Les brins passagers ont été synthétisés totalement en ARN ou totalement et partiellement en 2'OMe, comme le montre la [Figure IV.8](#).

Passager Nm'	
3' UAACCGUGACGUGUACUAACGA 5'	ARN
UAACCGUGACGUGUACUAACGA	2'OMe
UAACCGUGACGUGUACUAACGA	2'OMe(5')
UAACCGUGACGUGUACUAACGA	2'OMe(M)
UAACCGUGACGUGUACUAACGA	2'OMe(3')
UAACCGUGACGUGUACUAACGA	2'OMe(3'/M/5')

Figure IV.8 : Positions des modifications chimiques dans la séquence. Exemple du brin passager Nm'.

## 2. Synthèse

Les deux brins constituant les analogues de miR-96 ont été synthétisés séparément sur support solide par la méthode des phosphoramidites puis purifiés par HPLC comme précédemment décrit. Ils ont ensuite été hybridés pour former les duplexes attendus à partir d'un mélange équimolaire de chaque partenaire. L'hybridation a été réalisée dans de l'eau ultra pure par chauffage à 95°C pendant 3 min puis par refroidissement du système à température ambiante pendant 30 minutes.

Pour nommer les molécules synthétisées, nous avons adopté la nomenclature suivante ([Figure IV.9](#)) :

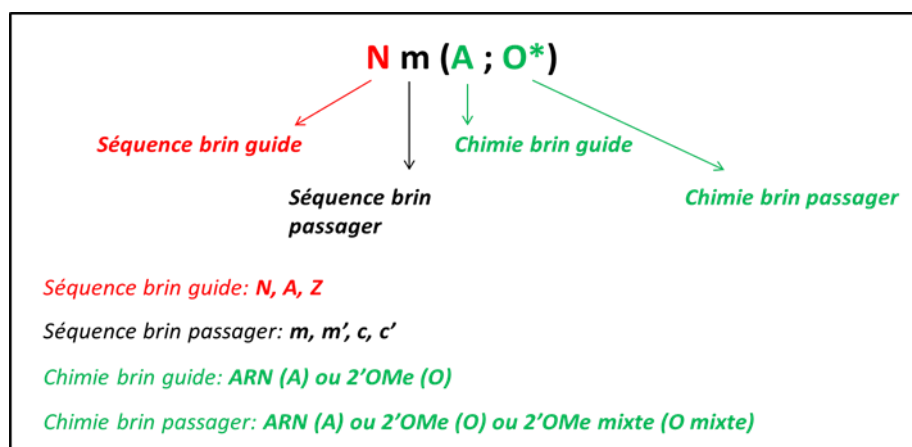


Figure IV.9 : Nomenclature adoptée pour les analogues de miR.

Les analogues de miR-96 synthétisés sont présentés dans le tableau suivant (Tableau IV.2):

Séquence	GUIDE N		GUIDE A	GUIDE Z		
	Chimie	ARN	2'Ome	ARN	ARN	
Passager* type m	ARN	Nm(A;A*)	Nm(O;A*)	Am(A;0*)	Zm(A;0*)	
	2'Ome	Nm(A;0*)	Nm(O;O*)			
Passager* type m'	ARN	Nm'(A;A*)		Am'(A;0*)	Zm'(A;0*)	
	2'Ome	Nm'(A;0*)				
	mixte ARN /2'Ome	Nm'(A;O*)(5')				
		Nm'(A;O*)(3')				
		Nm'(A;O*)(M)				
Nm'(A;O*)(5'/M/3')						
Passager* type c	ARN	Nc(A;A*)	Nc(O;A*)	Ac(A;0*)	Zc(A;0*)	
	2'Ome	Nc(A;0*)	Nc(O;O*)			
	mixte ARN /2'Ome	Nc(A;O*)(5')				
		Nc(A;O*)(3')				
		Nc(A;O*)(M)				
Nc(A;O*)(5'/M/3')						
Passager* type c'	ARN	Nc'(A;A*)	Nc'(O;A*)	Ac'(A;0*)	Zc'(A;0*)	
	2'Ome	Nc'(A;0*)	Nc'(O;O*)			
	mixte ARN /2'Ome	Nc'(A;O*)(5')				
		Nc'(A;O*)(3')				
		Nc'(A;O*)(M)				
Nc'(A;O*)(5'/M/3')						

Tableaux IV.2 : Récapitulatif et nomenclature des analogues de miR-96 synthétisés.

### 3. Expériences de dénaturation thermique

Les expériences de dénaturation thermique ont permis d'étudier la stabilité des analogues de miR-96 synthétisés en fonction des modifications (de séquence ou chimiques) apportées.

La dénaturation thermique constitue une des méthodes les plus utilisées pour analyser la stabilité des oligonucléotides. Dans ces expériences, le degré d'avancement de la réaction d'hybridation en fonction de la température est suivi par spectroscopie d'absorbance UV. Cette absorbance est due aux bases aromatiques des acides nucléiques qui ont maximum d'absorption à 260 nm, avec un coefficient d'absorption molaire de l'ordre de  $10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  par base.

A basse température, les brins forment un duplexe de coefficient d'absorption molaire inférieur à celui des simples brins. Cet hypochromisme est lié à l'empilement des bases dans la structure double hélice.

Inversement, lorsque l'appariement des bases est rompu, par chauffage par exemple, les deux brins se séparent et les bases sont exposées au solvant aqueux augmentant leur absorption de 20 à 40 % par rapport à l'état apparié: c'est l'effet hyperchrome.

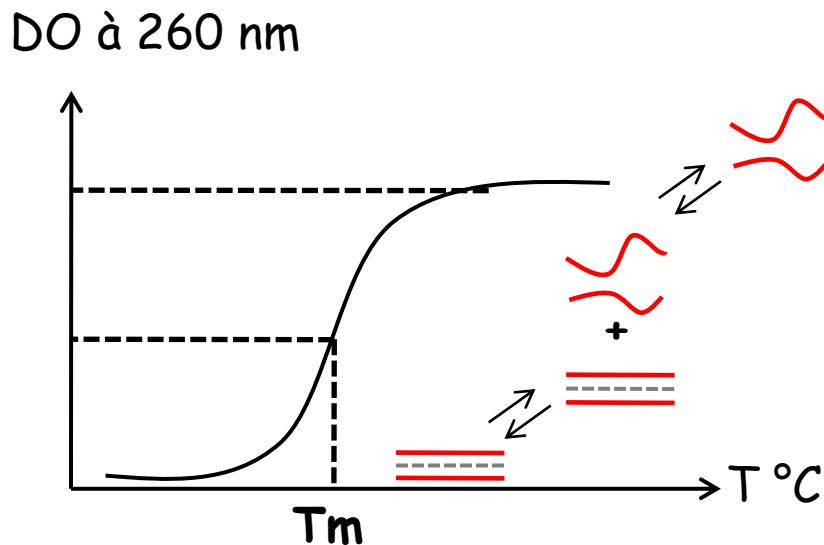


Figure IV.10 : Mesures de  $T_m$ .

En suivant l'absorbance d'une solution d'ARN ou d'ADN en fonction de la température, il est ainsi possible de déterminer la température de fusion ( $T_m$ ) de la double hélice. Par définition, celle-ci correspond à la température pour laquelle la moitié de l'ADN ou ARN est désapparié (Figure IV.10).

Si l'on suppose que les grandeurs d'absorbance du simple et du double brin varient linéairement avec la température, la courbe de l'absorbance en

fonction de la température est une sigmoïde à partir de laquelle il est possible d'obtenir les grandeurs thermodynamiques de réaction.

Les valeurs de  $T_m$  correspondent au maximum de la dérivée 1<sup>ère</sup> à la courbe.

Les expériences de dénaturation thermique ont été réalisées avec un spectrophotomètre d'absorption Cary 1E UV-Visible possédant un bloc Peltier Cary pour contrôler la température (Varian, Inc). Les ON ont été préparés dans un tampon cacodylate contenant 20 mM de NaCl, 140 mM de KCl, 10mM de cacodylate de sodium ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>Na) et 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7, à une concentration finale de 1μM.

Les expériences de fusion ont été réalisées par 4 cycles de montées /descentes en température de 5 à 90°C, à la vitesse de 1°C/min. Les données sont analysées par le logiciel Cary-Thermal et corrigées par rapport au signal du tampon seul. Chaque mesure a été réalisée au moins trois fois.

Les résultats ont montré, de façon non surprenante, que le duplexe entièrement ARN était moins stable que le duplexe 2'OMe correspondant (variation de  $T_m$  de 8°C) (Figure IV.11). Cette stabilisation a été moindre quand un seul des deux brins a été modifié. Il est intéressant de remarquer que l'augmentation du  $T_m$  a été supérieure avec le brin passager modifié.

Dans la famille Nm', l'analyse des résultats obtenus pour les différents brins passagers mixtes (ARN/2'OMe) a montré que les modifications en milieu de séquence stabilisaient d'avantage le duplexe par rapport aux modifications faites aux extrémités. Dans cette série, il n'est pas surprenant que le duplexe dont le brin passager mixte a le plus de modifications 2'OMe ait été le plus stable de tous les mixtes. Mais de façon générale, les différences de  $T_m$  entre tous les mixtes était assez faible, environ de 4°C (Figure IV.11).

En ce qui concerne les variations de séquences des brins guides, de façon surprenante, les duplexes avec des extrémités alignées (m' et c'), comportant des zones de mésappariements ou non, se sont montrés globalement plus stables que les duplexes aux extrémités décalées correspondants (m et c). La comparaison des 3 familles (N, A et Z) a également montré que les duplexes de la famille A étaient généralement moins stables que les autres (Figure IV.11).

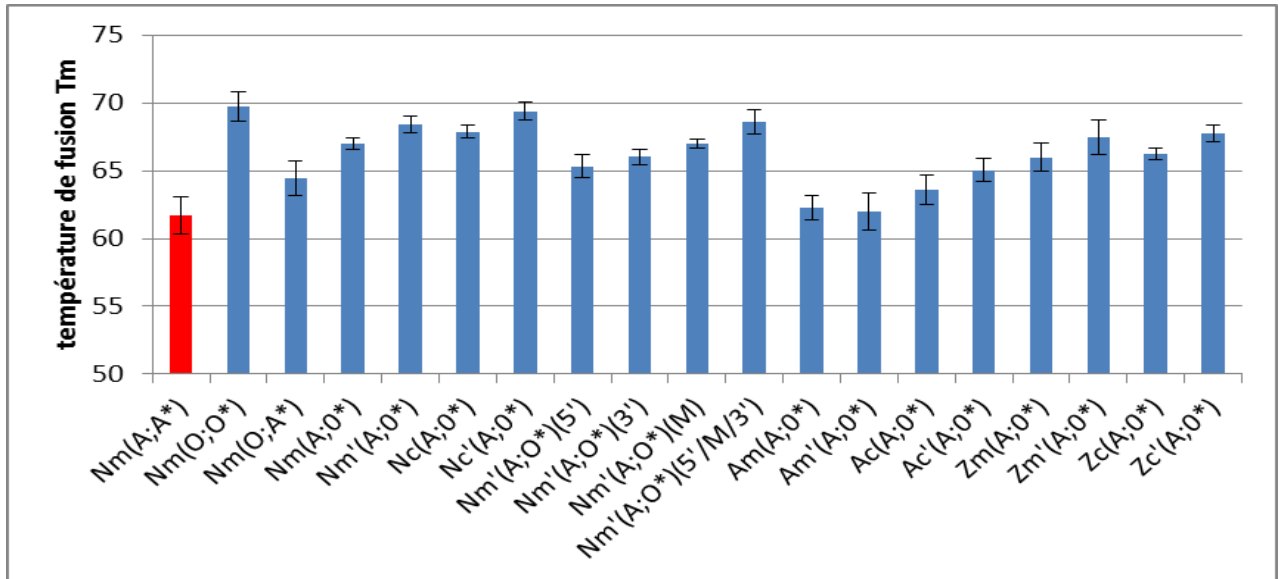


Figure IV.11 : Résultats des expériences de dénaturation thermique (Tm) des analogues de miR.

Il sera intéressant de voir par la suite si les variations de Tm observées ont eu une influence sur les résultats biologiques de ces analogues de miR-96.

## 4. Evaluation biologique

### 4.1. La méthode du FUNREG

L'évaluation biologique des analogues de miR-96 synthétisés a été réalisée par le système DF-FunREG (Dual-fluorescenceFunREG) développé au sein de l'équipe de Christophe Grosset (GREF, INSERM 1053, Bordeaux) [183]. Cette méthode permet de mesurer avec précision la régulation post-transcriptionnelle d'une protéine induite par les miARN exogènes ou endogènes après interaction avec la région 3' non traduite de l'ARNm cible. Pour cela, ils ont préparé par transfection lentivirale une lignée cellulaire exprimant 2 transgènes (TOMATO et eGFP) appelée TGG (TOMATO and eGFP-GPC3-3'U). Les 2 transgènes dépendent du même promoteur et se distinguent uniquement par la présence de la région 3' non traduite du GPC3 présent sur le transgène d'intérêt. Le transgène de contrôle, code pour la protéine fluorescente TOMATO tandis que le transgène d'intérêt code pour l'eGFP. Les 2 transgènes sont exprimés de la même manière puisqu'ils dépendent du même promoteur et qu'ils sont soumis au même environnement cellulaire. De ce fait, la différence d'expression des 2

protéines ne peut être attribuée qu'à la régulation post-transcriptionnelle exercée par les miARN.

La régulation post-transcriptionnelle est ainsi évaluée et quantifiée par normalisation de l'expression de l'eGFP par rapport à celle de la TOMATO (Figure IV.12).

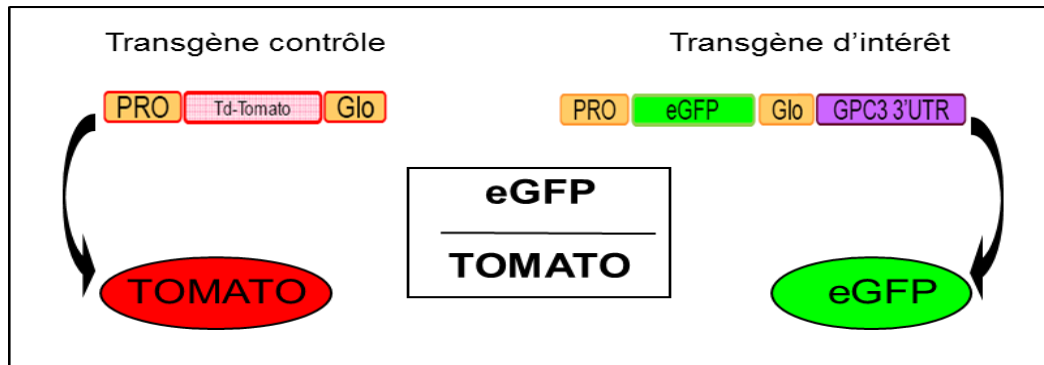


Figure IV.12 : Schéma explicatif du système DF-FunREG.

Cette méthode présente de nombreux avantages :

- l'établissement de lignées stables par transfection lentivirale des différents transgènes
- l'absence de toxicité pour les cellules
- la facilité d'utilisation et la polyvalence
- le criblage post-transcriptionnel de nombreuses molécules

#### 4.2. Expériences

Tous les analogues de miARN ont été transfectés par transfection inverse dans les cellules TGG à une concentration finale de 20 nM, en utilisant la Lipofectamine ARNi Max (Invitrogen) comme agent de transfection.

Deux molécules contrôles ont été utilisées :

- un miARN inactif, le siLuc qui n'interagit pas avec la région 3' non traduite du GPC3 et qui n'aura donc aucune influence sur l'expression de l'eGFP (contrôle négatif)

- un miR-96 commercial (fournisseur : Dharmacon ou Sigma) qui possède une activité post-transcriptionnelle sur l'eGFP (contrôle positif).

Les cellules ont ensuite été incubées pendant 72 heures puis analysées par cytométrie en flux pour mesurer la fluorescence de la TOMATO et de l'eGFP.

Pour cela, un analyseur de cellules BD LSR Fortessa (BD Biosciences), avec au minimum un millier d'événements cellulaires observés a été utilisé. Une compensation de fluorescence de 0,3% a été appliquée à la TOMATO.

Pour chaque puits, le rapport GFP/TOMATO a été calculé et normalisé par rapport au rapport obtenu dans les puits contrôles, en présence de siLuc.

### **4.3. Résultats et discussion**

Dans un premier temps, nous avons commencé les évaluations des analogues de miR-96 avec la détermination des meilleurs brins guides, en fonction de leur séquence et de leur nature chimique.

La [Figure IV.13\(A\)](#) montre par exemple les résultats DF-FunREG de la famille de molécules Nm avec les brins en ARN ou 2'OMe. Les molécules les plus efficaces sont celles qui possèdent le brin guide avec une chimie en ARN comme la molécule naturelle. Ceci est confirmé par les résultats « rassemblés » issus des données précédentes [Figure IV.13\(B\)](#) qui montrent qu'il s'agit effectivement de la tendance générale observée. La 2<sup>ème</sup> information est que l'effet de l'analogue est légèrement meilleur lorsque le brin passager est en 2'OMe [Figure IV.13\(A\)](#).

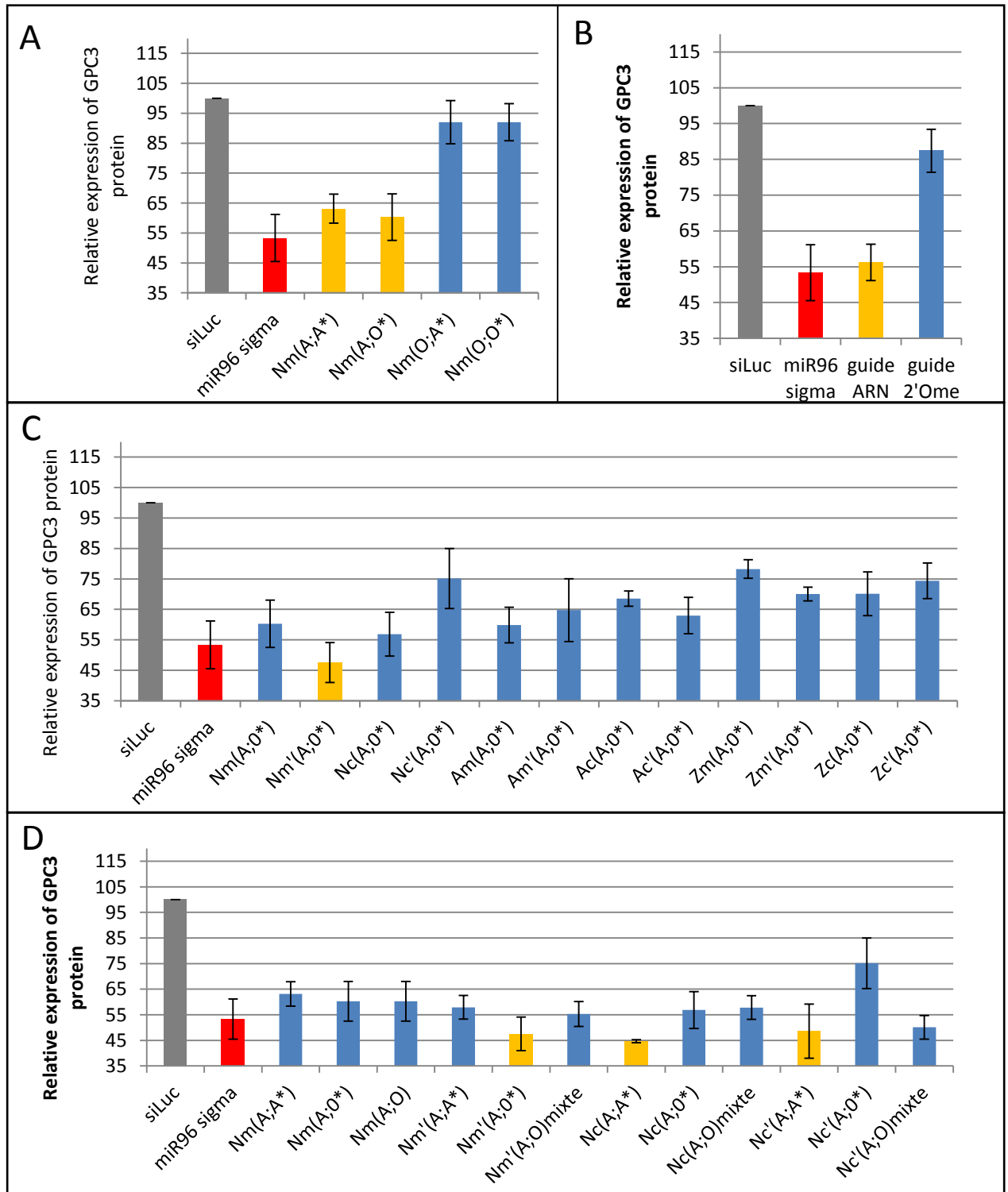


Figure IV.13 : Résultats des expériences DF-FunREG. Expression relative de GPC3 après transfection des analogues de miR-96 en fonction de séquence et la nature chimique du brin guide (A,B,C), du brin passager(D).



Dans un deuxième temps, nous avons comparé toutes les familles de brins guides (N, A, Z) associés avec leurs différents brins passagers (m, m', c, c') (Figure IV.13(C)). Les brins guides sont tous en ARN et les brins passagers en 2'OMe. Ces résultats ont permis de sélectionner le duplexe qui induit la meilleure inhibition de l'expression du transgène eGFP-GPC3. Il s'agit de l'analogue **Nm'(A,O\*)** constitué d'un brin guide à séquence naturelle (**N**) en ARN (**A**) et d'un brin passager possédant des mésappariements et des extrémités alignées (**m'**) en 2'OMe (**O\***).

Il semble donc intéressant de garder la séquence du brin guide correspondante à celle du miARN naturel. C'est cette séquence **N** qui a été choisie pour la suite de l'étude.

Dans un troisième temps, les positions des modifications chimiques 2'OMe sur les brins passagers ont été diversifiées: aux extrémités et en milieu de séquence comme nous l'avons vu précédemment ( Cf Figure IV.8).

Les résultats DF-FunREG de la Figure IV.13(D) ont permis de voir l'impact de ces modifications chimiques (sur le brin passager). Pour simplifier leur présentation les valeurs des duplexes à brin passager partiellement 2'OMe (2'OMe(5'), 2'OMe(3'), 2'OMe(M), 2'OMe(3'/M/5')) ont été « rassemblés » sous la dénomination « mixte ». Dans la famille Nm', le duplexe portant le brin passager entièrement 2'OMe a été le plus efficace, et ceux à brins passagers mixtes ARN/2'OMe étaient comparables au duplexe à brin passager ARN.

Dans la famille Nc, le brin passager entièrement ARN a été le plus efficace, et les brins passagers mixtes ARN/2'OMe étaient comparables au brin passager entièrement 2'OMe.

Il est important de remarquer qu'il n'y a pas de corrélation entre la stabilité des duplexes (mesures de Tm) et les résultats biologiques obtenus. Ce n'est pas parce qu'une molécule est plus stable qu'elle a une diminution d'activité qui pourrait être le résultat d'une plus difficile déshybridation dans le complexe RISC.

En comparant l'ensemble des résultats, trois analogues Nm'(A;O\*), Nc(A;A\*) et Nc'(A;A\*) se sont distingués des autres, mais nous avons choisi de sélectionner l'analogue Nm'(A;O\*) car les brins passagers c et c', ne donnent des duplexes efficaces qu'en chimie ARN. Or il est préférable de sélectionner une molécule modifiée chimiquement car celle-ci sera plus résistante lors de sa délivrance.

Le duplexe retenu est donc **Nm'(A;O\*)** constitué d'un brin guide à séquence naturelle (**N**) en ARN (**A**) et d'un brin passager possédant des mésappariements et des extrémités alignées (**m'**) en 2'OMe (**O\***).

## **V. Optimisation des oligonucléotides amphiphiles**

Dans un premier temps, l'optimisation de la partie oligonucléotidique nous a permis de sélectionner après évaluation biologique, le meilleur analogue de miR-96 parmi les molécules synthétisées.

Dans un deuxième temps, l'analogue sélectionné a été bioconjugué avec diverses molécules hydrophobes. Ces ONA ont été caractérisés par des études physico-chimiques, puis criblés fonctionnellement.

### **1. Design des ONA**

Le design des ONA a reposé sur les variations de différents paramètres comme :

#### ➤ la nature de la partie hydrophobe

Dans le chapitre concernant la synthèse des ONA, nous avons vu que des chaînes hydrophobes lipidiques de diverses natures ont été utilisées. L'intérêt du couplage avec ces molécules lipidiques réside dans leur capacité à faciliter l'internalisation cellulaire des oligonucléotides qui, naturellement, sont incapables de franchir la barrière membranaire.

Cette bioconjugaison va aussi permettre à nos analogues de miR-96 de pouvoir s'associer à la SAH, plateforme de délivrance choisie dans le cadre de cette étude.

La première molécule lipidique qui a été utilisée est le cholestérol (Chol) dont l'efficacité d'internalisation a déjà été démontrée. Elle se fait par endocytose après ancrage du cholestérol dans les membranes, ou encore par l'intermédiaire de récepteurs de lipoprotéines avec lesquels le cholestérol pourrait interagir.

Des bioconjugaisons par des chaînes carbonées de différentes tailles : des chaînes lauriques (12 carbones, C12), myristiques (14 carbones, C14), stéariques (18 carbones, C18) et une chaîne perfluorocarbonée (CF) ont également été envisagées.

#### ➤ la position des parties hydrophobes

Les modifications hydrophobes ont été essentiellement introduites sur le brin passager afin de ne pas perturber l'interaction miARN/ARNm nécessaire à l'activité biologique du brin guide.

Concernant leurs positions, la bioconjugaison a été réalisée aux extrémités 3' et 5' du brin passager, mais aussi en milieu de séquence. Dans ce cas, la modification a été faite au niveau d'une zone de mésappariement

(l'analogue oligonucléotidique retenu Nm'(A;O\*) possédant des mésappariements) afin de ne pas déstabiliser les duplexes brin guide/brin passager.

➤ Ratio oligonucléotide / nombre de parties hydrophobes

Un des avantages de la bioconjugaison, par rapport à d'autres méthodes de vectorisation, est que le ratio entre les 2 molécules mises en jeu est parfaitement contrôlé. Nous avons tiré parti de cette caractéristique pour envisager des ONA bioconjugués avec 1, 2 et 3 molécules hydrophobes.

## 2. Synthèse des ONA

### 2.1. Contribution de la stratégie pré-synthétique

La stratégie pré-synthétique utilise des phosphoramidites préalablement modifiés avec les molécules hydrophobes et qui sont couplés sur l'oligonucléotide pendant sa synthèse automatisée, sur support solide.

Cette stratégie nous a permis de coupler des molécules de cholestérol sur nos oligonucléotides en utilisant différents phosphoramidites commerciaux. Le cholestérol a ainsi été introduit aux 2 extrémités 3' et 5' de l'oligonucléotide, avec des espaceurs de longueurs différentes, stables ou clivables (ponts disulfures) (Figure IV.14).

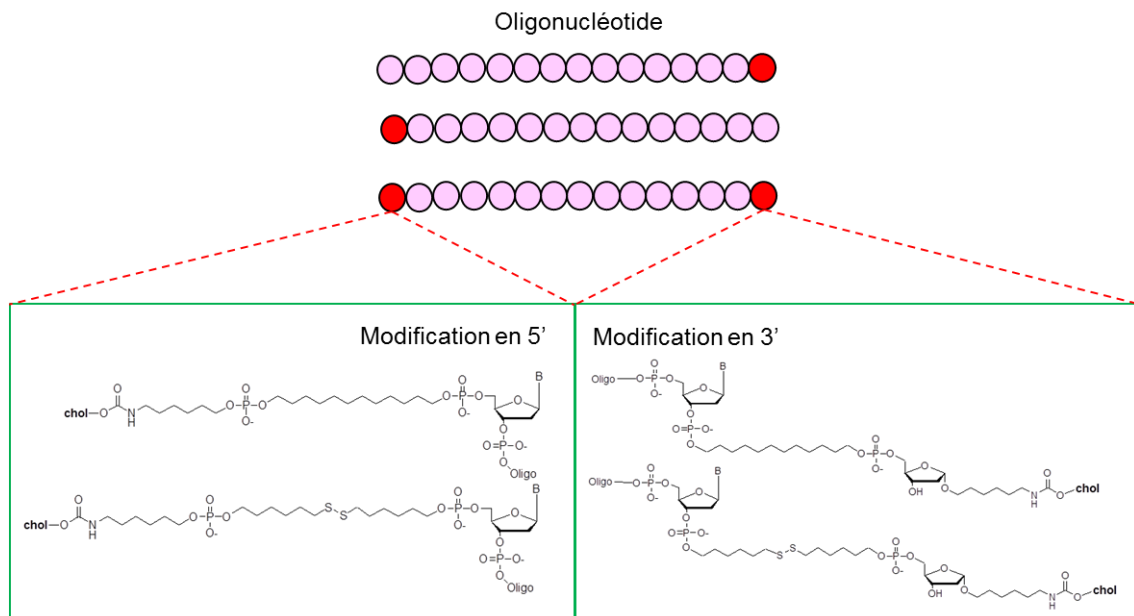


Figure IV.14 : Nature et position des modifications cholestérol apportées par la stratégie pré-synthétique (avec des phosphoramidites commerciaux : ●).

## 2.2. Contribution de la stratégie post-synthétique

Par la suite, nous avons mis en place une stratégie post-synthétique dans laquelle la chimie clic *via* la cyclo-addition 1,3-dipolaire a été utilisée pour le couplage direct des lipides sur les oligonucléotides après leur synthèse complète.

Cette deuxième stratégie, plus convergente, nous a permis d'introduire une grande variété de lipides (Chol, C12, C14, C18, CF) avec la possibilité de modifier n'importe quelle position de l'oligonucléotide (3', 5', milieu M) (Figure IV.15).

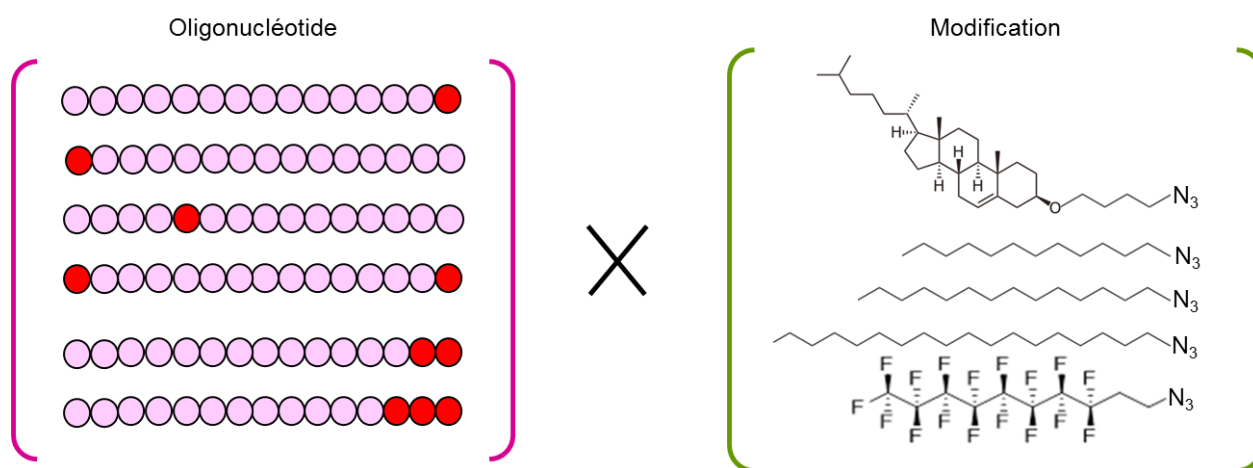


Figure VI.15 : Nature et position des modifications hydrophobes apportées par la stratégie post-synthétique (avec des bases alcynes ● et des lipides azides synthétisés au laboratoire).

### 2.3. Chimiothèque des ONA synthétisés

Pour nommer les molécules synthétisées, nous avons adopté la nomenclature suivante (Figure IV.16) :

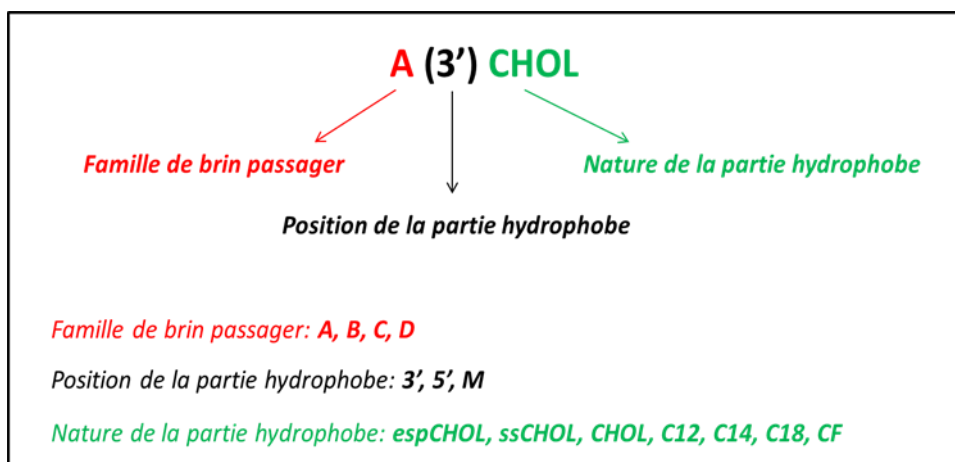


Figure VI.16 : Nomenclature adoptée pour les analogues modifiés.

Les molécules synthétisées ont été répertoriées dans le [Tableau IV.3](#) :

Position et nombre	Stratégie pré-synthétique		Stratégie post-synthétique				
	Nature		Nature				
	espCHOL	SSCHOL	CHOL	C12	C14	C18	CF
A(3')	A(3')espCHOL	A(3')SSCHOL	A(3')CHOL	A(3')C12	A(3')C14	A(3')C18	A(3')CF
A(M)			A(M)CHOL	A(M)C12	A(M)C14	A(M)C18	A(M)CF
A(5')	A(5')espCHOL	A(5')SSCHOL	A(5')CHOL	A(5')C12	A(5')C14	A(5')C18	A(5')CF
B	BespCHOL	BSSCHOL		BC12	BC14		BCF
C				CC12	CC14		CCF
D				DC12	DC14		DCF

Tableau IV.3 : Récapitulatif et nomenclature des analogues de miR-96 modifiés.

### 3. Caractérisations physico-chimiques des ONA

#### 3.1. Expérience d'électrophorèse native

Comme pour la synthèse des analogues de miARN non modifiés, la synthèse des brins guides et passagers a été faite séparément, puis le brin guide non modifié et le brin passager amphiphile ont été hybridés pour donner les analogues de miR-96 amphiphiles.

Nous avons tout d'abord voulu vérifier les capacités d'hybridation de ces 2 brins, c'est-à-dire la formation des duplexes amphiphiles. Pour cela des expériences d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif ont été effectuées.

Le gel suivant montre que les brins passagers bioconjugués forment des duplexes avec le brin guide de façon identique au brin passager non-modifié. Des bandes plus fines de taille supérieure à celle des duplexes sont également observées probablement liées aux assemblages supramoléculaires induits par les molécules hydrophobes ([Figure IV.17](#)).

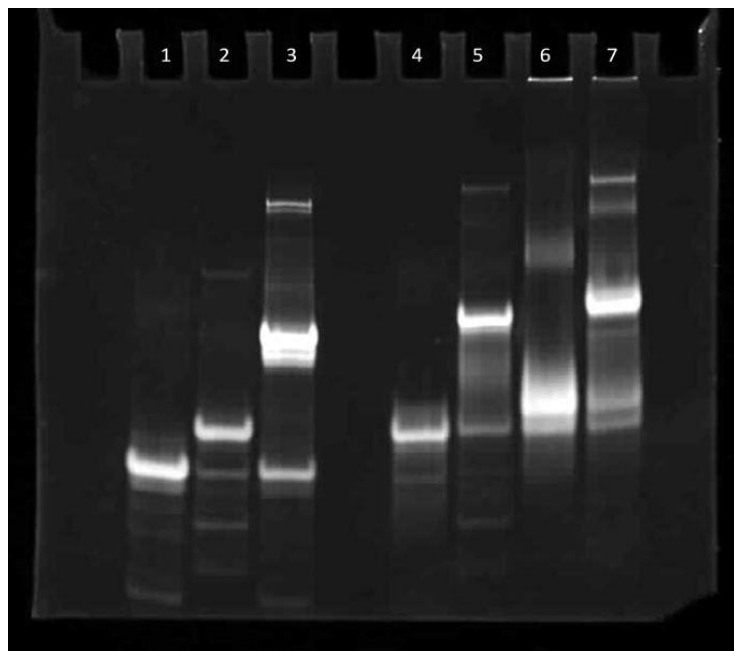


Figure IV.17 : PAGE natif : 1. brin passager ; 2. brin guide ; 3. duplexe miR-96 non-modifié ; 4. brin passager ACF; 5. duplexe ACF ; 6. brin passager CCF ; 6. duplexe CCF

#### 3.2. Expériences de dénaturation thermique

Afin de vérifier la stabilité des duplexes amphiphiles formés, des expériences de dénaturation thermique ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les oligonucléotides non modifiés.

L'impact des molécules hydrophobes bioconjuguées, en fonction de leur nature, de leur position et de leur nombre dans la séquence oligonucléotidique, a ainsi pu être apprécié.

Pour simplifier l'analyse des résultats, seules les valeurs les plus significatives sont présentées. Un tableau général (Tableau IV.4 (A et B)) à la fin de ce chapitre récapitule l'ensemble des expériences réalisées sur les molécules de la chimiothèque. Les  $T_m$  d'un certain nombre de molécules, quand elles n'apportaient rien à la discussion, ne sont donc pas présentes dans la figure suivante (Figure IV.18).

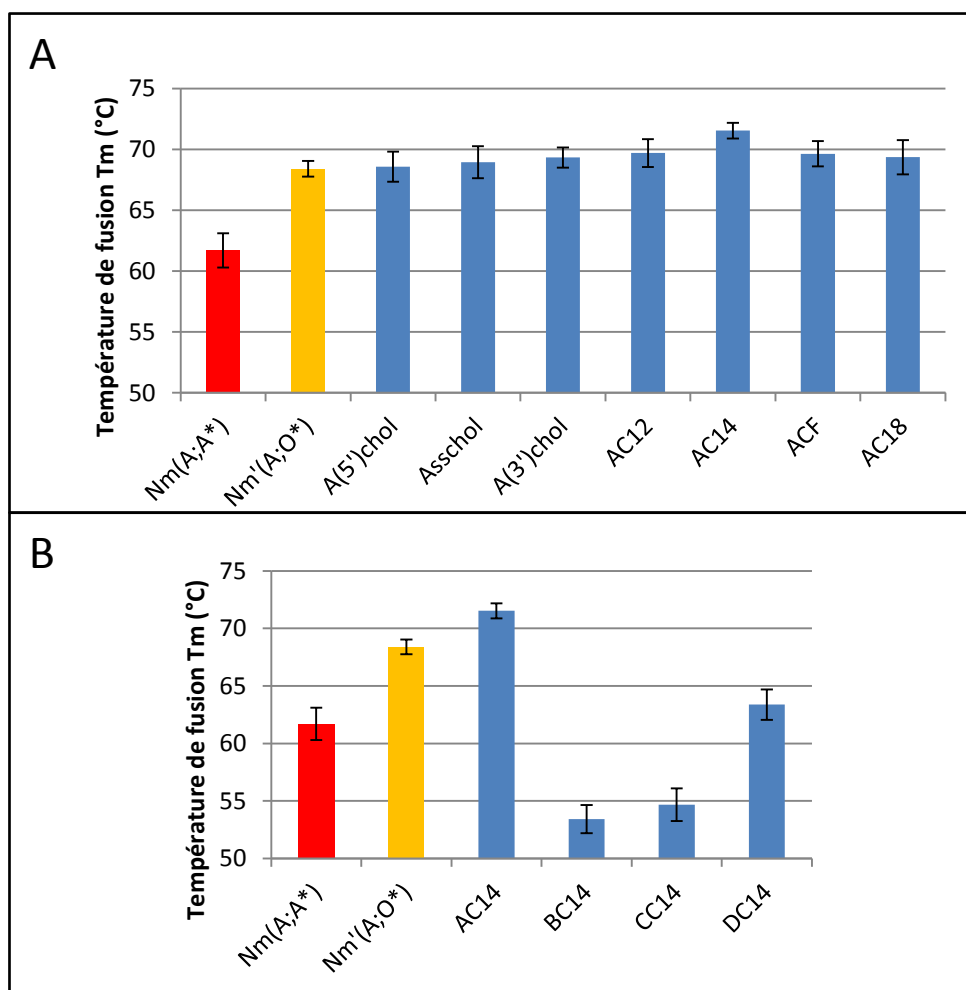


Figure IV.18 : Résultats des expériences de dénaturation thermique.  $T_m$  en fonction de la nature de la modification (A) et du nombre (B).

Pour une famille donnée (famille A), l'influence de la nature du vecteur hydrophobe sur la stabilité des duplexes a tout d'abord été étudiée (Figure IV.18(A)). Le contrôle est le miR-96 naturel (ARN) Nm'(A ;A). Le duplexe Nm'(A ;O) correspond à l'analogue de miR-96 optimisé au laboratoire. Incluant une chimie modifiée de type 2'OMe sur le brin passager, il n'est pas

étonnant que sa valeur de  $T_m$  ait été supérieure à celle du miR-96 naturel. L'ajout d'un seul vecteur hydrophobe en position 3' du brin passager (AC12, AC14, ACF) a augmenté la stabilité du duplexe de 2-4 °C par rapport au contrôle non modifié. La valeur de  $T_m$  la plus importante a été obtenue avec l'ONA portant une chaîne myristyle (AC14). Cette légère augmentation est en accord avec les résultats obtenus par Laign et al. en 2010 [184].

Pour un même vecteur hydrophobe (CF), l'étude des  $T_m$  en fonction des familles A, B et D a ensuite été faite (Figure IV.18(B)). La présence de trois chaînes perfluorocarbonées à l'extrémité 3' (DCF) a diminué la stabilité des duplexes de 2 °C par rapport au contrôle n' et de 4 °C par rapport au duplexe ne possédant qu'une seule chaîne perfluorocarbonée (ACF). Les trois chaînes grasses sont encombrantes et perturbent la stabilité du duplexe.

Il est intéressant de remarquer que c'est la présence d'une chaîne perfluorocarbonée à chaque extrémité du brin passager (BCF) qui a eu la plus grande influence sur les valeurs de  $T_m$  avec une diminution de 4 °C par rapport au contrôle et de 6 °C par rapport à l'ONA à simple chaîne (ACF).

Ainsi l'étude de la température de fusion des duplexes amphiphiles a montré qu'une simple modification hydrophobe des ON stabilisait les duplexes formés alors qu'au contraire l'ajout de deux ou trois chaînes hydrophobes les déstabilisait.

### **3.3. Expérience de MET**

Les ONA, de par leurs propriétés amphiphiles, sont susceptibles de former des complexes supramoléculaires. Cette organisation peut s'avérer être extrêmement favorable pour la pénétration cellulaire. Afin d'observer ces éventuels assemblages, l'étude des molécules par microscopie électronique à transmission a été effectuée (MET). Comme pour les  $T_m$ , toutes les images obtenues par MET n'ont pas été présentées. La Figure IV.19 montre un exemple des résultats obtenus avec des ON possédant une, deux ou trois chaînes myristyle (AC14, BC14 et DC14). Les images montrent une hétérogénéité de population quelle que soit la famille considérée (Figure IV.19). Des objets de la taille de micelles (quelques nm) sont présents mais ils cohabitent avec des agrégats de tailles plus importantes. Cette hétérogénéité est retrouvée lors de l'utilisation de diffusion de la lumière (technique DLS).

Lors de ces expériences, les molécules ont été étudiées à la concentration maximale utilisée dans les tests biologiques soit 1  $\mu$ M. Les valeurs de CMC (concentration micellaire critique) de nos ONA n'ont pas été déterminées mais des données de la littérature reportent des CMC d'une centaine de  $\mu$ M pour des oligonucléotides de 20 nt portant un reste cholestérol [185]. Il ne



semble donc pas étonnant qu'aux concentrations utilisées, des assemblages supramoléculaires ne puissent être clairement visualisés.

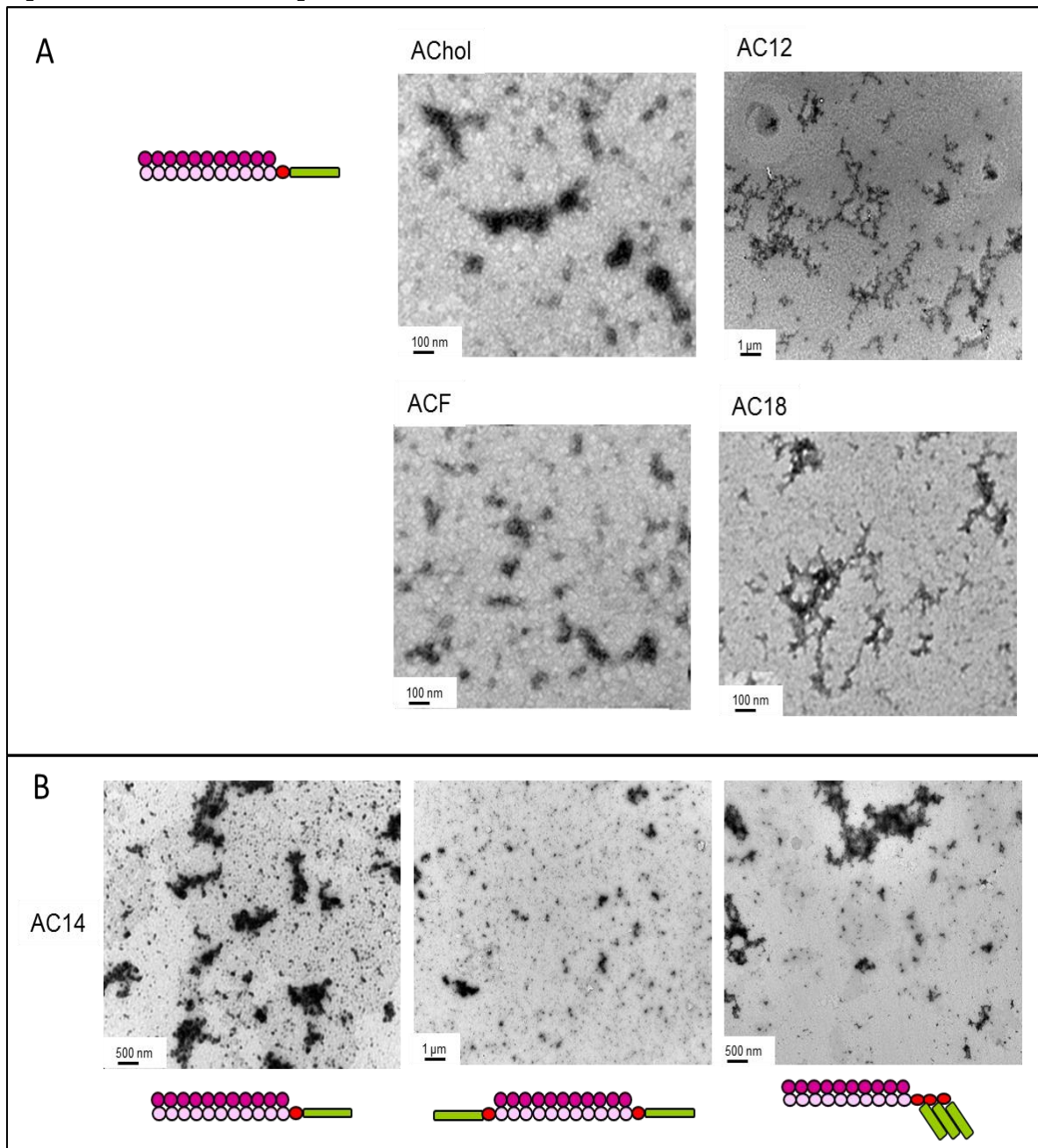


Figure IV.18 : Images de MET des ONA, en fonction de la nature de la modification (A) et du nombre (B).

#### 4. Etude de la pénétration cellulaire des ONA

##### 4.1. Expériences de microscopie à fluorescence

Avant l'évaluation biologique des analogues de miR-96 amphiphiles, nous avons voulu vérifier leur capacité à être internalisées dans des cellules sans agent de transfection.

Pour cela, des expériences de microscopie à fluorescence ont été réalisées sur des cellules Huh7 (lignée cellulaire du CHC) incubées avec des ONA fluorescents, marqués à la fluorescéine (6 FAM) pendant 4 heures à une concentration de 1  $\mu\text{M}$ .

La sonde fluorescente a été introduite *via* un phosphoramidite commercial, en position 5' lors de la synthèse sur support. La modification hydrophobe a ensuite été réalisée par cyclo-addition 1,3-dipolaire *via* la stratégie post-synthétique comme décrit précédemment. Dix analogues fluorescents ont été ainsi synthétisés.

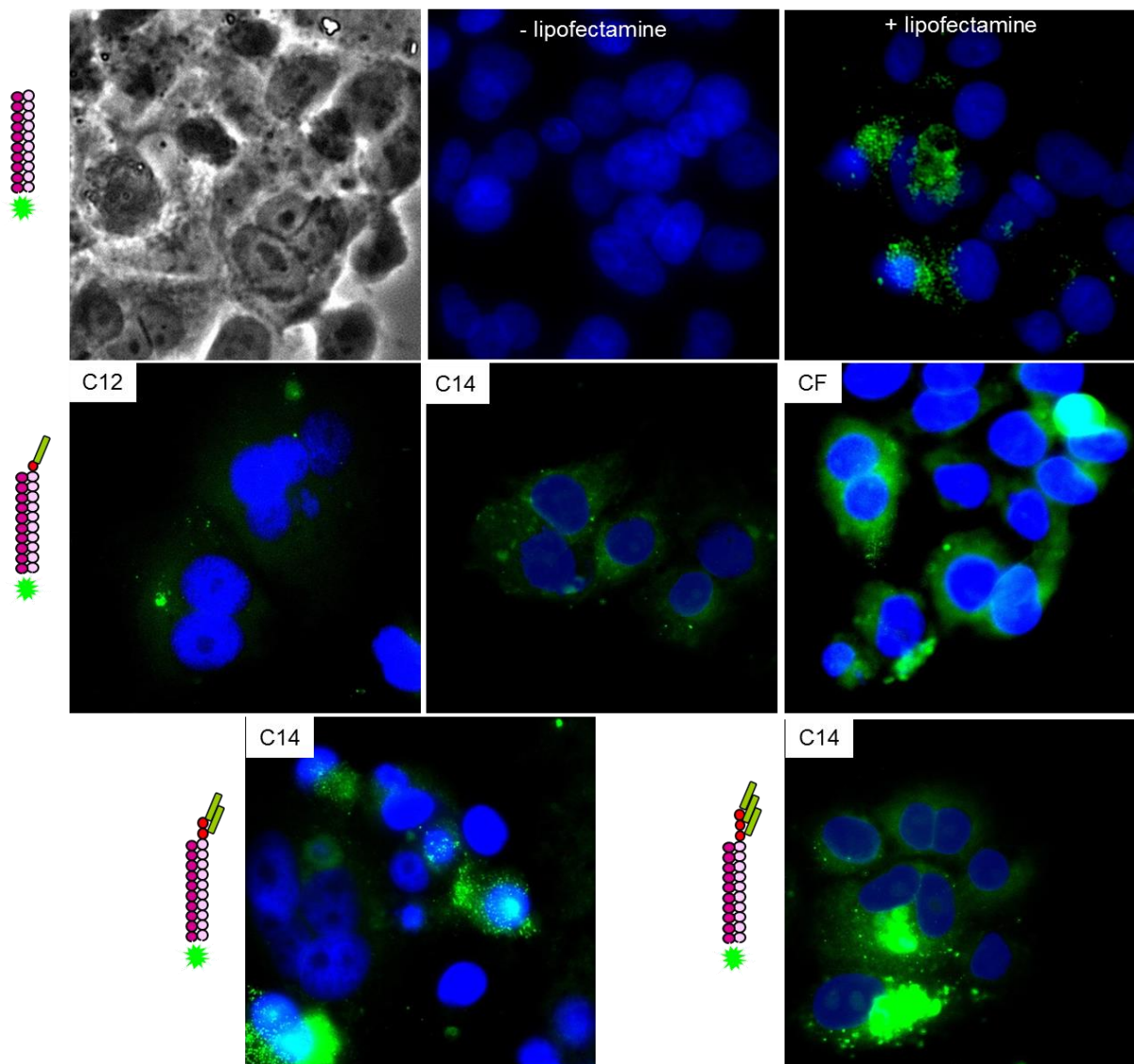


Figure IV.20 : Image de microscopie à fluorescence. Marquage des analogues de miR-96 amphiphiles par la fluoresceine (vert).

L'étude de pénétration cellulaire par microscopie de fluorescence a montré que les analogues bioconjugués rentraient dans les cellules et s'accumulaient dans l'espace cytoplasmique (Figure IV.20, exemples ACF,

CCF, CC14, DC14). Ceci est valable pour tous les ON fluorescents testés quels que soient la nature et le nombre de modifications hydrophobes.

## 4.2. Expérience de microscopie confocale

Pour compléter le premier travail de pénétration cellulaire, une étude des voies de pénétration a été réalisée par microscopie confocale. L'objectif était de déterminer les voies d'endocytose impliquées dans l'internalisation des ONA. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Patrick Midoux (CMB, UPR 4301, Orléans).

L'endocytose constitue l'entrée dans la cellule de macromolécules (vésicules, nanoparticules...). Elle dérive de l'invagination et de la séparation de fragments de membrane plasmique. La Figure IV.21 suivante montre les différentes voies d'endocytose utilisées par la cellule [185]. Elles dépendent, entre autre, de la taille et de la nature des molécules à internaliser.

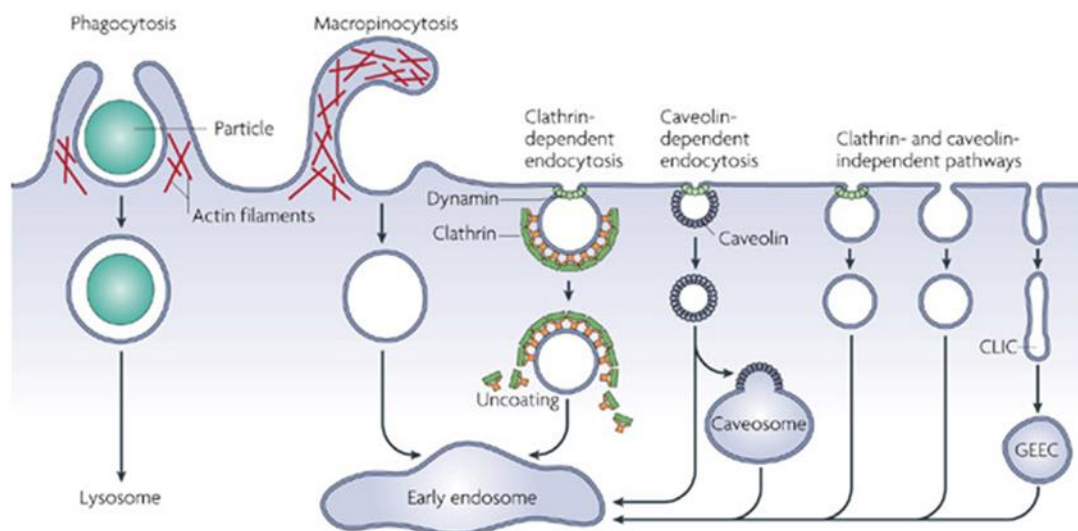


Figure IV.21 : Les différentes voies d'endocytose.

De multiples mécanismes d'endocytose ont été décrits à ce jour et aucun d'entre eux ne peut être exclu pour l'internalisation des ONA.

Cependant, compte tenu des caractéristiques de ces différentes voies et des premiers éléments de la littérature, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux voies clathrine dépendante et cavéoline dépendante.

La voie d'endocytose la plus commune et la mieux caractérisée est celle médiée par la clathrine, principale protéine des structures membranaires. Cette voie implique l'assemblage des chaînes de clathrine, les « triskèles » qui ont la capacité de s'auto-assembler pour former des puits recouverts de clathrine. Après le détachement de ces néo-vésicules dont la taille varie de 100 à 150 nm de diamètre, le manteau de clathrine est rapidement dépolymérisé et les vésicules fusionnent avec d'autres conduisant à la formation d'endosomes précoces puis tardifs.

La voie d'endocytose médiée par la cavéoline implique des microdomaines hydrophobes riches en cholestérol et sphingolipides appelés radeaux lipidiques. Les cavéoles sont de petites vésicules (50-60 nm de diamètre) classiquement définies comme des invaginations de la membrane plasmique qui sont bordées par la cavéoline-1.

Pour réaliser ces expériences d'internalisation cellulaire, les cellules Huh7 ont été transfectées avec des plasmides qui permettent le marquage fluorescent de protéines caractéristiques des 2 principales voies d'endocytose. Les protéines Rab5 et Rab7 marquent respectivement les endosomes primaires et tardifs de la voie médiée par la clathrine, tandis que la protéine Cav1 marque la voie médiée par la cavéoline [186].

Les cellules Huh7 exprimant les transgènes pRab5-EGFP, pRab7-EGFP (Figure IV.22) et pCav1-GFP (Figure IV.23), ont été incubées avec les analogues de miR-96 fluorescents (AC18 et ACHOL). AC18 et ACHOL ont été marqués par une sonde TAMRA en position 3', introduite lors de la synthèse automatisée, à l'aide d'un support modifié. Les molécules ont été incubées à différentes concentrations allant de 0.2 à 2  $\mu$ M, pendant 3 et 6 heures.

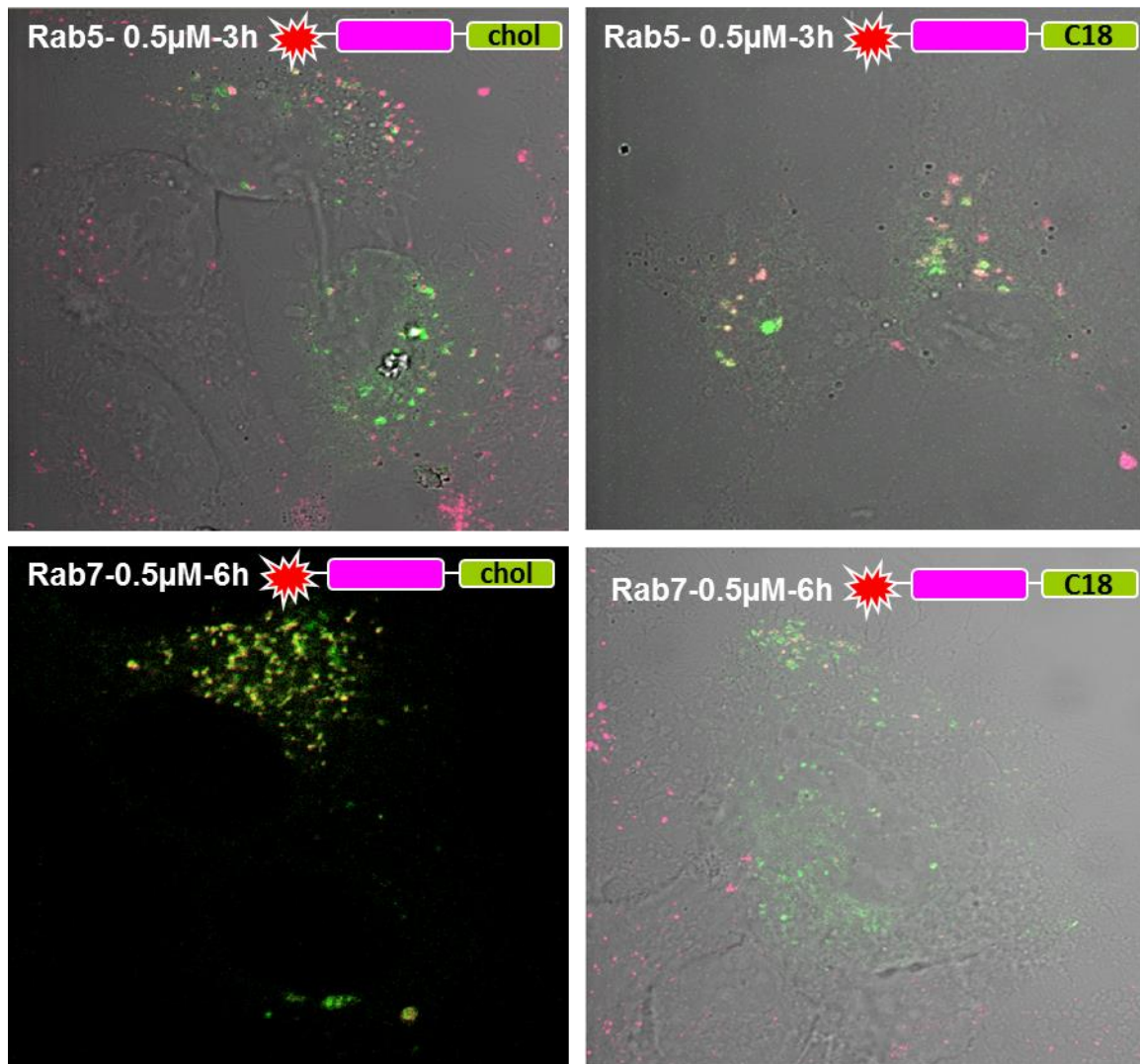


Figure IV.22 : Image de microscopie confocale. Marquage des endosomes primaires et tardifs via les protéines Rab5 et Rab7 respectivement (en vert), marquage des ONA-C18 et CHOL par le TAMRA.

En conclusion, on peut dire que les ONA cholestérol semblaient capables d'emprunter aussi bien les voies d'endocytose médiée par la clathrine que par la cavéoline. Dans la voie clathrine dépendante, ils paraissaient colocalisés uniquement dans les vésicules rab7-EGFP.

Dans le cas des ONA C18, les résultats étaient plus difficiles à interpréter car les phénomènes de colocalisation étaient assez faibles pour les deux voies étudiées.

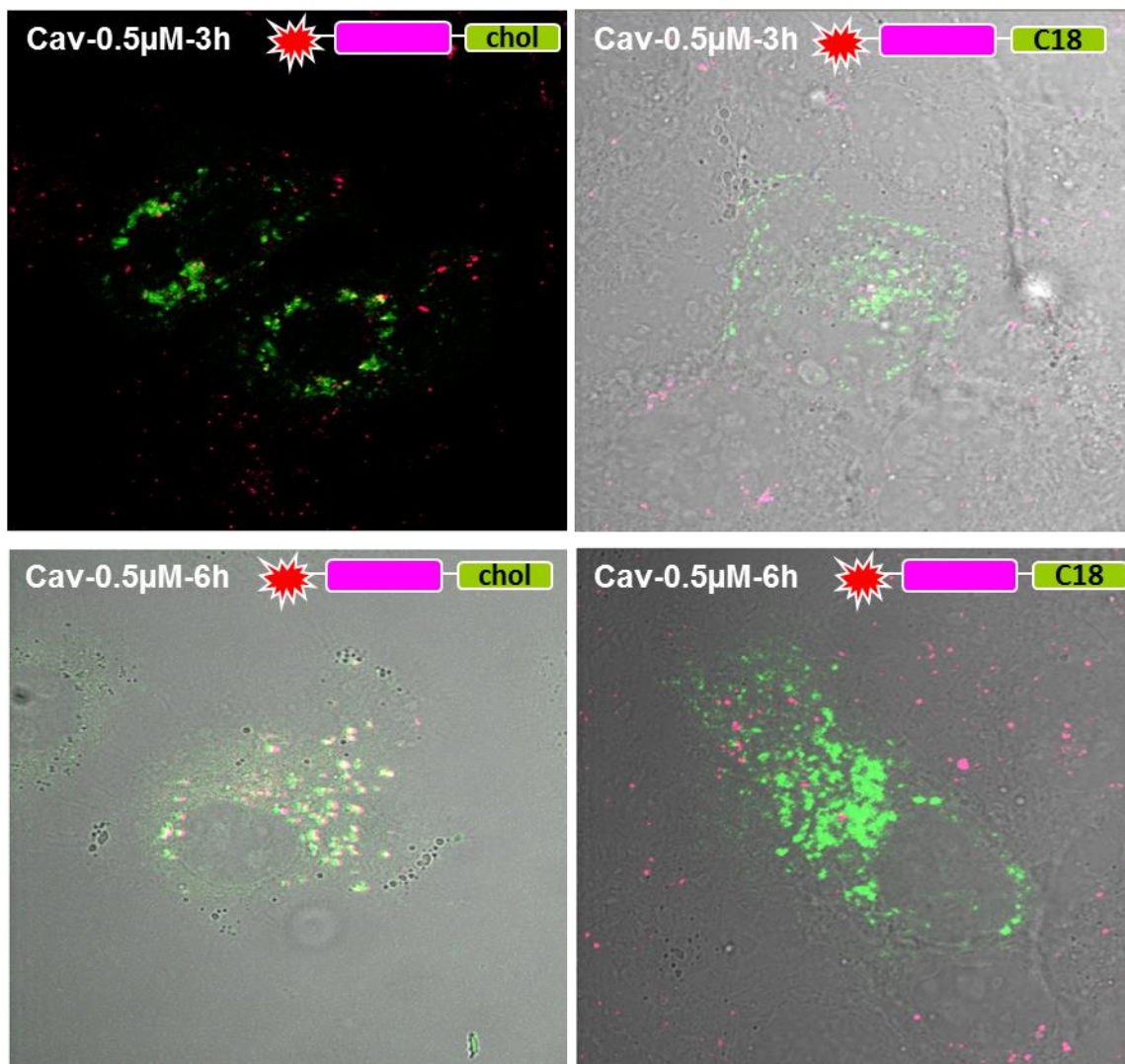


Figure IV.23 : Image de microscopie confocale. Marquage des cavéoles (en vert), marquage des ON-C18 et CHOL par le TAMRA.

## 5. Evaluation biologique

Les tests ont été faits dans deux conditions : classiquement à l'aide d'un agent de transfection telle que la lipofectamine et sans agent de transfection pour voir l'aptitude des ON bioconjugués à pénétrer seuls dans les cellules et à atteindre leur cible.

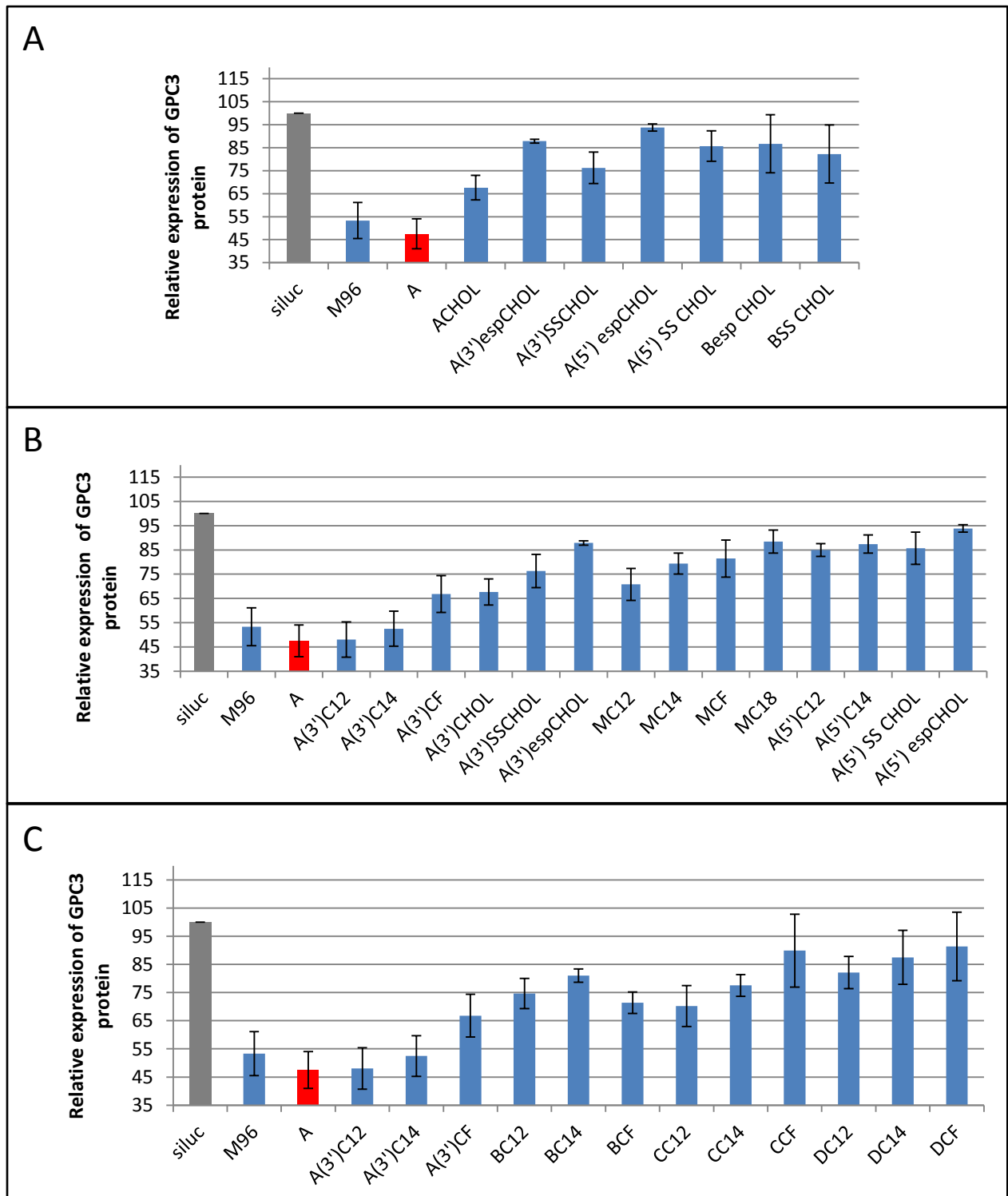


Figure IV.24 : Résultats des expériences DF-FunREG. Expression relative de GPC3 après transfection des ONA, en fonction de la nature, de la position et du nombre de modifications hydrophobes.

Les résultats obtenus après transfection des analogues amphiphiles (à 20 nM dans des cellules TGG après 72 heures d'incubation) sont présentés dans la [Figure IV.24](#).

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la famille d'ONA dérivés de phosphoramidites cholestérol commerciaux ([Figure IV.24\(A\)](#)) comportant des restes cholestérol aux extrémités 3' et ou 5' avec un lien clivable (pont disulfure) ou non.

La présence du cholestérol n'a pas empêchée l'activité des analogues de miR-96 mais l'efficacité était moindre (perte d'activité de 13% d'expression de GPC3) par rapport à l'oligonucléotide non modifié correspondant. Par contre avec la présence de cholestérol aux deux extrémités, les molécules ont été très peu actives. Il est surprenant de remarquer que l'utilisation de liens clivables de type disulfure n'a pas amélioré l'activité des ONA.

Nous avons ensuite évalué tous les analogues simplement modifiés, par différents résidus hydrophobes et à différentes positions ([Figure IV.24\(B\)](#)).

Dans l'ensemble, l'analyse des résultats a montré que les couplages en position 3' conduisaient à une meilleure efficacité de la molécule et ce, quelle que soit la nature du lipide conjugué. L'analogue amphiphile A(3')C12 induisant une expression d'environ 48 % de GPC3, possédait la même efficacité que l'analogue non modifié (47%). Il a été suivi par son homologue en C14, un peu moins efficace mais qui a induit tout de même une expression de 52%. A(3')CF a eu une activité similaire à celle du résidu cholestérol (67%) ([Figure IV.24\(B\)](#)).

Concernant l'extrémité 5', l'expression relative de la GPC3 a été comprise entre 85 et 95 % traduisant une absence d'activité de ces ONA conjugué en 5' ([Figure IV.24\(B\)](#)).

En milieu de séquence, la meilleure inhibition a été observée avec l'analogue MC12 (70%) ([Figure IV.24\(B\)](#)).

Les résultats des tests DF-FunREG avec les analogues possédant un ratio oligonucléotide/molécule hydrophobe de 2 et 3 sont présentés dans la ([Figure IV.24\(C\)](#)). Ces modifications n'ont été réalisées qu'en position 3' car nous venons de voir qu'elle avait conduit aux meilleurs résultats. En ce qui concerne la nature des lipides, nous nous sommes concentrés sur les résidus C12, C14 et CF. L'analyse des résultats a montré que l'efficacité était inversement proportionnelle au ratio. Par exemple, l'analogue A(3')C12 qui possédait la meilleure activité, a perdu 20 et 30% d'activité par ajout de deux et trois chaînes C12.

Cette tendance a été généralement observée quelle que soit la nature la chaîne hydrophobe considérée.



Finalement nous avons évalué tous les analogues amphiphiles sans l'utilisation d'agent de transfection, sur les cellules TGG à 1  $\mu\text{M}$  après 72 heures d'incubation.

Malheureusement, nous n'avons observé aucun effet sur l'expression de la protéine cible, même avec les analogues A(3')C12 et A(3')C14 qui avait une activité proche de la molécule non modifiée (Figure IV.25).

Ces résultats laissent penser que les ONA, bien qu'ils soient internalisés, n'arrivent pas à atteindre leur cible parce qu'ils restent piégés dans les endosomes.

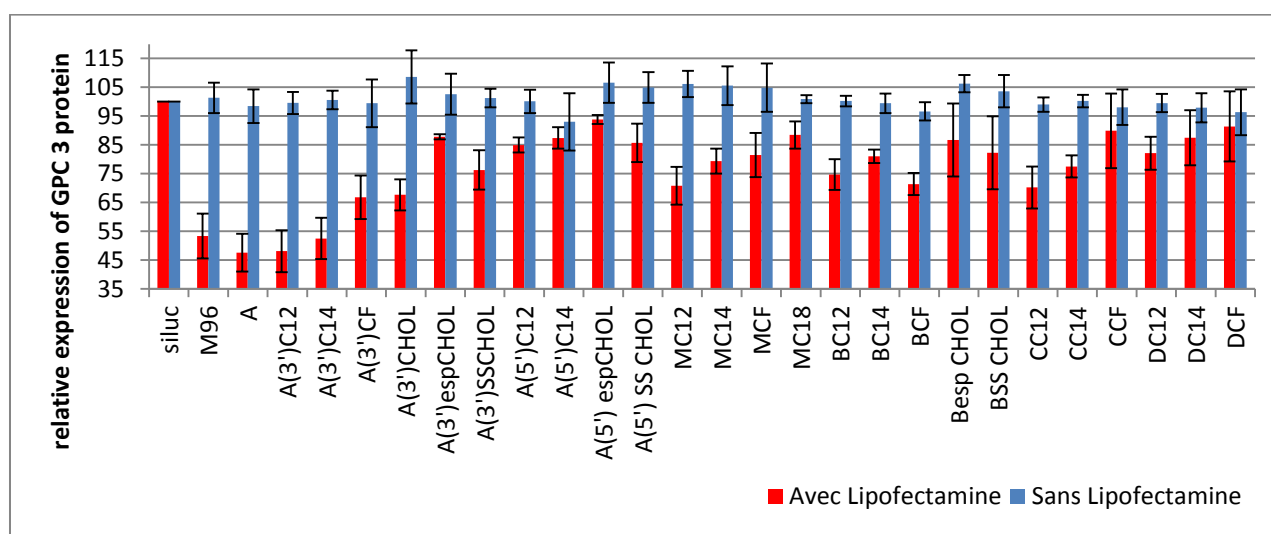


Figure IV.25 : Résultats des expériences DF-FunREG. Expression relative de GPC3 après transfection des ONA, avec ou sans Lipofectamine.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons effectué une expérience avec un prétraitement par la chloroquine qui est connue pour induire l'éclatement des endosomes [187]. Les cellules ont été mises en contact avec une gamme de concentrations croissantes de chloroquine (10-100  $\mu\text{M}$ ) pendant 3 heures. Après un lavage par du PBS les ONA ont été transfectés selon la procédure classique DF-FunREG (avec ou sans lipofectamine). L'analyse par cytométrie en flux trois jours plus tard a montré un nombre très restreint de cellules dans toutes les conditions testées. La chloroquine est connue pour avoir un effet anti-prolifératif à concentrations élevées [188]. Nous supposons que les cellules Huh7 ont été très sensibles à son action même à faibles concentrations (10-30  $\mu\text{M}$ ).

Dans un troisième temps, la mise en place de la nanoplateforme à base de Sérum albumine humaine a été effectuée grâce à l'interaction des ONA avec cette dernière.

## **VI. Mise en place de la nanoplateforme**

### **1. Etude de l'interaction SAH-ONA par SPR**

L'étude de l'interaction entre la SAH et les analogues de miR-96 amphiphiles a été réalisée par Résonance plasmonique de surface. Les expériences ont été effectuées sur un Biacore équipé d'une puce CM5.

La puce CM5 est couramment utilisée pour l'immobilisation d'un grand nombre de ligands allant des petites molécules organiques, des acides nucléiques et des glucides aux protéines. Elle est composée d'une matrice dextran modifiée avec des fonctions acides carboxyliques.

Le couplage se fait par l'établissement d'une fonction peptidique entre les fonctions acides de la matrice et les groupes amines primaires sur le ligand après activation de la surface avec le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) - carbodiimide (EDC) et de N-hydroxysuccinimide (NHS).

L'immobilisation de la SAH a été réalisée par l'injection de 30  $\mu\text{l}$  d'une solution de protéine à une concentration de 37,5 mg / ml dans 10 mM d'acétate de sodium, pH 5,2, à un débit de 5  $\mu\text{l}$  / min, conduisant à une fixation de 7000 à 9000 RU. Les surfaces ont ensuite été traitées par une injection d'éthanolamine 1M (pour masquer les sites acides carboxyliques n'ayant pas réagi), à pH 8,0, suivie par trois injections de 50 mM de soude (afin d'éliminer les protéines liées de manière non covalente).

De cette façon, le SAH, ainsi que la Streptavidine et l'anhydrase carbonique ont été immobilisées.

Les ONA, en simple ou double brins, ont été injectés sur les surfaces de protéines à des concentrations allant de 0,2 à 500  $\mu\text{M}$  à un débit de 20  $\mu\text{l}$  / min dans un tampon de course 53 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 70 mM de NaCl, pH 7,4. Chaque injection d'analyte a été suivie d'une injection de NaOH 50 mM et du tampon de course.

Pour chaque analyte et pour chaque concentration, au moins 3 injections ont été réalisées, à 25° C dans le tampon de course, dans un ordre aléatoire.

Toutes les données ont été doublement corrigées pour supprimer les contributions du tampon et des pistes témoins sur le signal.

Les constantes d'affinité ont été calculées à partir des courbes d'interaction obtenues, avec le logiciel Kaleidagraph.

## 2. Résultats et discussion

Les figures suivantes représentent les courbes d'interaction des différentes molécules avec la SAH.

L'analogue non modifié a eu une interaction quasi nulle avec la protéine contrairement aux analogues modifiés, dont l'affinité a varié en fonction de la nature du lipide conjugué.

Dans un premier temps, les expériences ont été réalisées avec les ONA sous forme de simple brin, pour évaluer l'impact de la nature du lipide sur l'interaction avec la SAH (Figure IV.26).

Les bionconjugués portant un résidu cholestérol (CHOL), myristique (C14), et stéarique (C18) ont interagi avec le ligand jusqu'à saturation. Ceci reflète un modèle d'interaction spécifique puisque celle-ci augmente jusqu'à atteindre un pallier de saturation.

Au contraire, la courbe d'interaction obtenue avec les résidus lauriques (C12) a été quasi linéaire même à concentrations relativement élevées. L'augmentation du signal d'interaction est quasi proportionnelle à la celle de la concentration, ce qui traduit des phénomènes d'interaction non spécifiques avec la SAH.

L'interaction avec les résidus perfluorocarbonés (CF) s'est faite selon un autre schéma. En effet une perte du signal d'interaction a été observée aux fortes concentrations testées.

Les constantes d'affinité des différents lipides ont été calculées à partir de ces courbes d'interaction, sur un modèle d'interaction de site unique, avec le logiciel Kaleidagraph.

Les ONA ont interagi avec la SAH avec des constantes d'affinité de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . En ce qui concerne les molécules simples brins, les meilleures affinités ont été observées avec les résidus C18, puis CHOL et finalement C14.

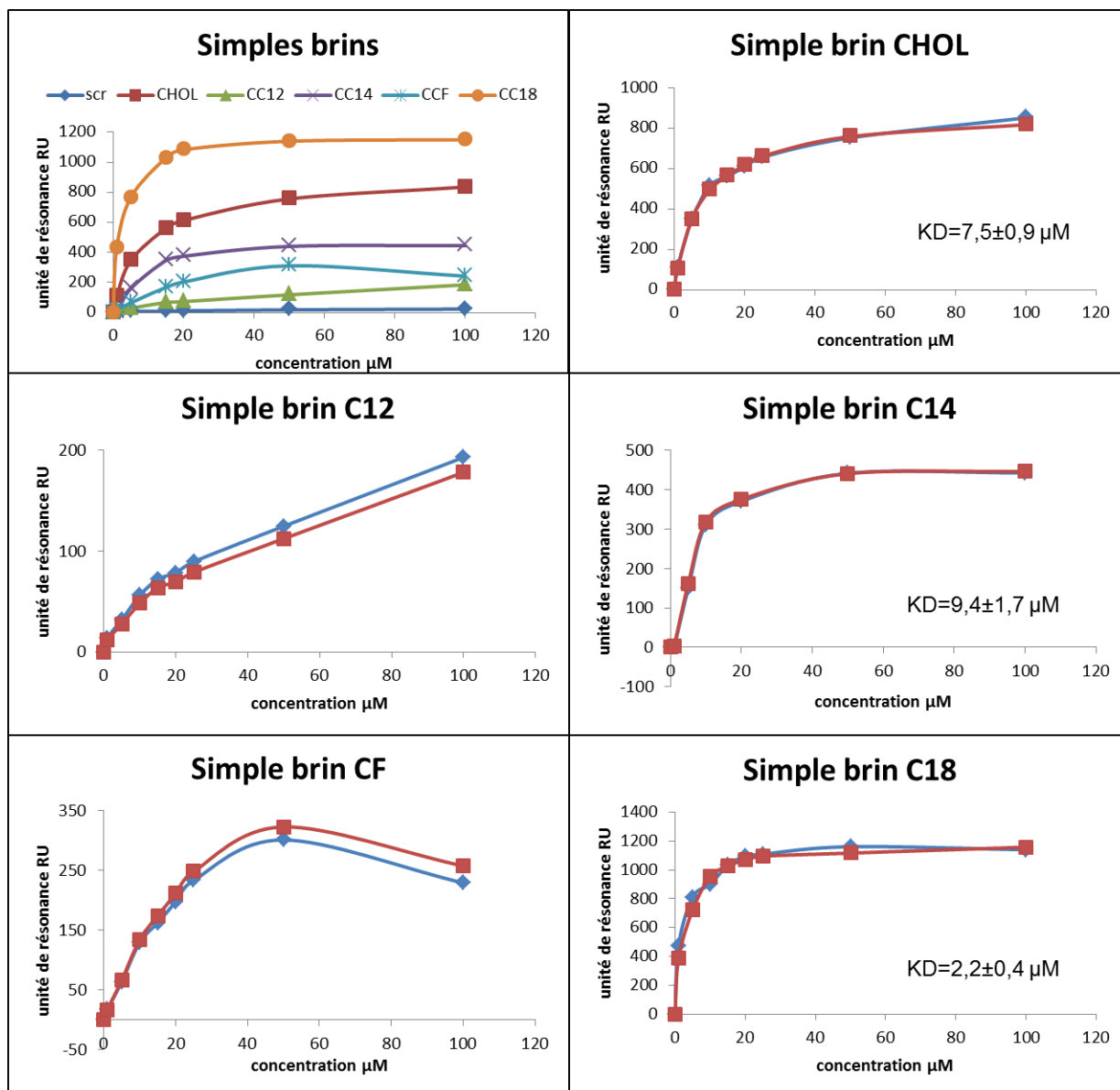


Figure IV.26 : Courbes d'interaction des ONA (simples brins) avec la SAH.

Dans un deuxième temps, nous avons testé et comparé les interactions des ONA avec deux autres protéines, la streptavidine (SA) et l'anhydrase carbonique (AC) (Figure IV.27). Ces expériences ont été réalisées pour savoir si les interactions précédemment observées étaient spécifiques de la SAH ou pouvaient se produire avec n'importe quelle autre protéine.

Dans le cas des résidus CHOL et C18, une interaction avec les deux nouvelles protéines, semblable à celle observée avec la SAH, et même avec des affinités plus importantes dans certains cas a été obtenue. Ceci laisse penser que ces 2 lipides ne sont pas spécifiques de la SAH, et sont capables d'interagir avec diverses protéines.

Les résidus C14 et CF, ont présenté une interaction linéaire avec la streptavidine et l'anhydrase carbonique reflétant une spécificité d'interaction avec la SAH.

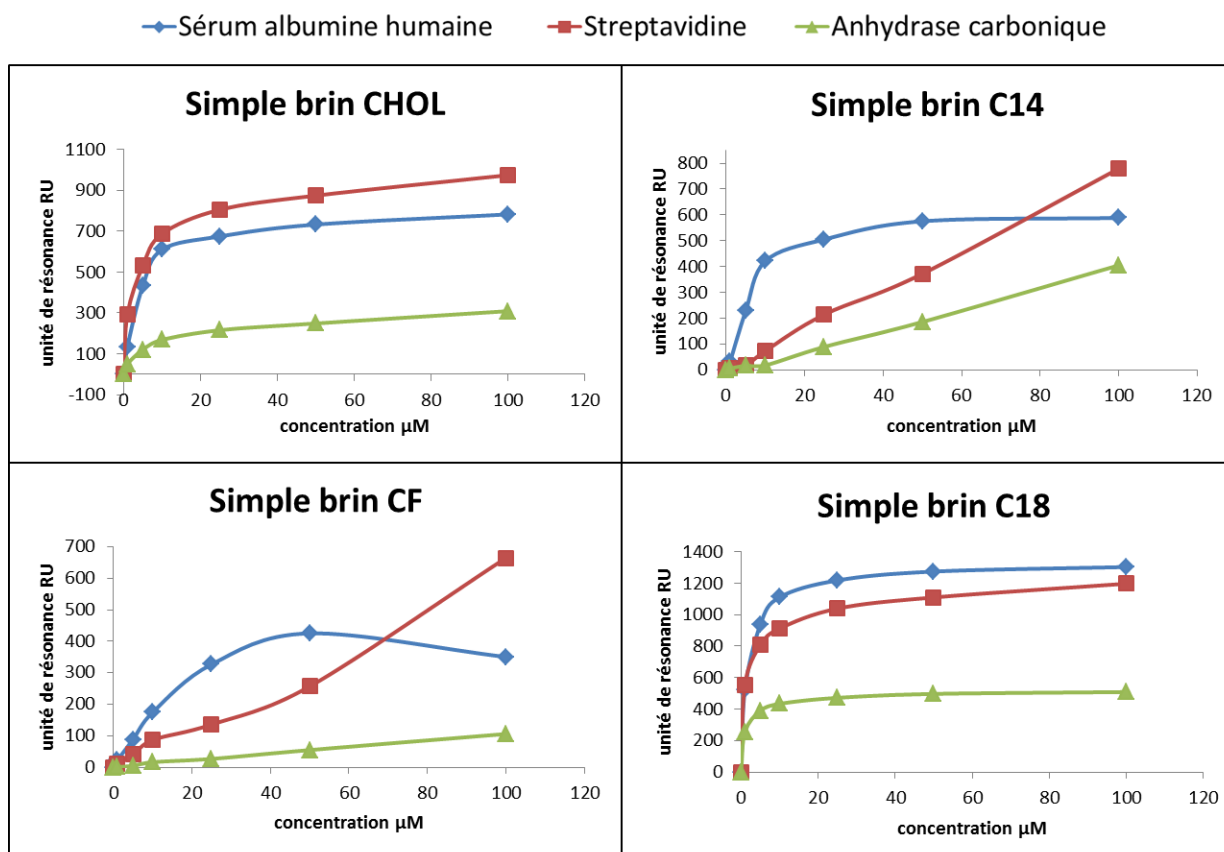
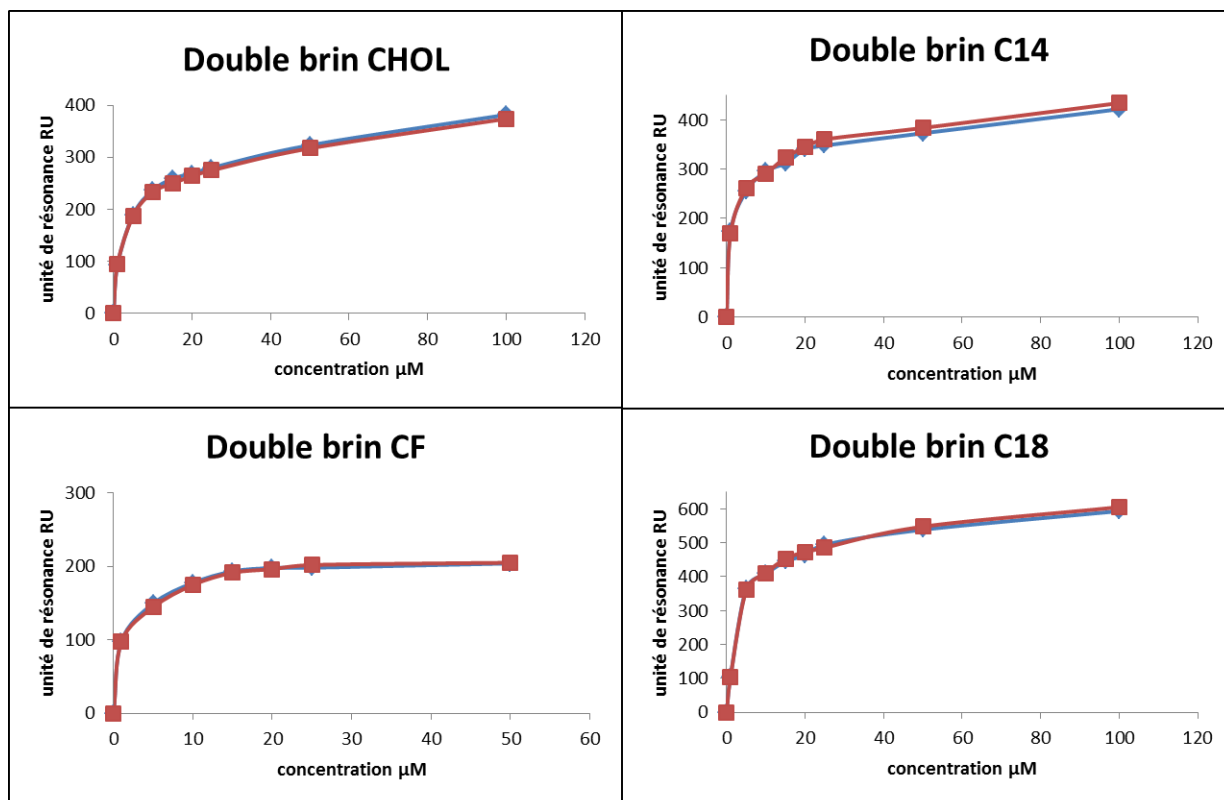


Figure IV.27 : Courbes d'interaction et  $K_d$  des ONA (simples brins) avec différentes protéines (SAH, SA et AC).

Finalement, nous avons évalué l'affinité des analogues en doubles brins pour la SAH (Figure IV.28).



	SIMPLE BRIN	DOUBLE BRIN
CHOL	7,5	4,1
C14	9,4	14,3
CF		1,3
C18	2,2	3,5

Figure IV.28 : Courbes d'interaction et  $K_d$  des ONA (double brins) avec la SAH.

Comme les simples brins, les ONA en double brins ont interagi avec le ligand (SAH) avec une affinité de l'ordre du micromolaire, mais quelques différences ont été observées.

Les analogues C18 ont toujours une bonne affinité même si celle-ci a diminué en passant de 2.2 à 3.5  $\mu\text{M}$ . C'est aussi le cas des résidus C14 dont le  $K_d$  augmente de 9.4 à 14.3  $\mu\text{M}$  (Figure IV.28).

Dans le cas des analogues CHOL, une amélioration de l'affinité a plutôt été observée, contrairement aux exemples précédents.

En ce qui concerne les analogues CF, le profil d'interaction avec la SAH a permis dans le cas des double brins de calculer une constante d'affinité, puisque la saturation a été atteinte. Le  $K_d$  qui a été de 1.3  $\mu\text{M}$  est le plus élevé (Figure IV.28).

Cette évaluation des interactions des analogues de miR-96 amphiphiles est préliminaire mais elle nous a déjà donné des informations intéressantes qui n'avaient encore jamais reportés dans la littérature.

## VII. Conclusions et perspectives

L'objectif de cette partie était de développer des molécules capables de contrôler les taux de miARN dérégulés dans les cellules cancéreuses. Cette partie de la thèse a été menée en collaboration avec l'équipe de Christophe Grosset (Unité Inserm U889 dirigée par Jean Rosenbaum) spécialisée dans le carcinome hépatocellulaire (CHC). Cette équipe a montré qu'un miARN, miR-96 était capable d'inhiber la prolifération des cellules de CHC en régulant une protéine, le glypican3, qui induit la prolifération des cellules hépatiques cancéreuses.

La stratégie employée a été celle du remplacement de miARN qui consiste à délivrer dans la cellule des analogues de miR-96. Ces analogues de miARN possédaient une structure en double brin et ont été bioconjugués à des molécules hydrophobes qui devaient leur permettre l'ancrage sur la SAH et l'internalisation dans les cellules cibles.

Dans la phase d'optimisation de la partie oligonucléotidique, nous nous sommes inspirés de la structure du miR-96 naturel pour le design des analogues. Puis nous avons modifié leur séquence et leur chimie (2'OMe) pour leur conférer une résistance lors de leur délivrance. Ces analogues de miR-96 ont été criblés fonctionnellement par la méthode DF-FunREG, ce qui nous a permis de sélectionner le meilleur analogue de miR-96.

Dans la 2<sup>ème</sup> phase d'optimisation, la bioconjugaison des miARN avec des molécules lipidiques a été réalisée en variant différents paramètres : la composition chimique du lipide (chaînes grasses saturées, cholestérol, chaîne perfluorocarbonée), sa position dans la séquence (extrémité 3', 5' ou milieu de séquence) et le ratio oligonucléotide / lipide (de 1/1 à 1/3). Nous avons ainsi constitué une petite chimiothèque d'analogues de miR-96 amphiphiles.

Des études de caractérisations physico-chimiques ( $T_m$ , MET) sur ces dérivés ont été suivies d'expériences de pénétration cellulaire par microscopie de fluorescence après avoir préparé des analogues fluorescents. Elles ont confirmé l'internalisation des ONA préparés.

L'analyse DF-FunREG de ces miARN amphiphiles a ensuite été réalisée montrant qu'il était plus intéressant de placer la partie hydrophobe à l'extrémité 3' des oligonucléotides en se limitant à un ratio de 1/1.

Finalement nous avons testé la capacité des analogues de miR-96 amphiphiles à interagir avec la SAH dans le but final d'utiliser cette protéine comme plateforme de délivrance. Pour cela nous avons évalué l'affinité des

ONA précédemment sélectionnés pour la SAH. Des  $Kd$  de l'ordre du micromolaire ont pu être obtenus.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude en caractérisant les complexes SAH-ONA formés pour déterminer par exemple leur stœchiométrie et voir leur comportement en présence de la protéine SPARC. Il serait également intéressant de renforcer le ciblage hépatique en ajoutant aux ONA des restes galactoses. Des travaux en ce sens ont déjà été initiés.



	1	2
	Tm	FunREG
Nm(A;A*)	✓	✓
Nm(A;O*)	✓	✓
Nm(O;A*)	✓	✓
Nm(O;O*)	✓	✓
Nm'(A;A*)	✓	✓
Nm'(A;O*)	✓	✓
Nm'(A;O*)(5')	✓	✓
Nm'(A;O*)(3')	✓	✓
Nm'(A;O*)(M)	✓	✓
Nm'(A;O*)(5'/M/3')	✓	✓
Nc(A;A*)		✓
Nc(A;O*)	✓	✓
Nc(O;A*)		✓
Nc(O;O*)		✓
Nc(A;O*)(5')		✓
Nc(A;O*)(3')		✓
Nc(A;O*)(M)		✓
Nc(A;O*)(5'/M/3')		✓
Nc'(A;A*)		✓
Nc'(A;O*)	✓	✓
Nc'(O;A*)		✓
Nc'(O;O*)		✓
Nc'(A;O*)(5')		✓
Nc'(A;O*)(3')		✓
Nc'(A;O*)(M)		✓
Nc'(A;O*)(5'/M/3')		✓
Am(A;O*)	✓	✓
Am'(A;O*)	✓	✓
Ac(A;O*)	✓	✓
Ac'(A;O*)	✓	✓
Zm(A;O*)	✓	✓
Zm'(A;O*)	✓	✓
Zc(A;O*)	✓	✓
Zc'(A;O*)	✓	✓

Tableau IV.4(A) : Récapitulatif des expériences réalisées sur les analogues de miR-96 non modifiés (1: Température de fusion, 2 : Analyse de la régulation post-transcriptionnelle)

	1	2	3	4	5	6	7
	PAGE	Tm	TEM	MF	MC	FunREG	SPR
Nm'(A;O*)	✓	✓		✓		✓	✓
A(3')espCHOL		✓				✓	
A(3')SSCHOL		✓				✓	
A(3')CHOL		✓	✓		✓	✓	✓
A(3')C12		✓	✓	✓		✓	✓
A(3')C14	✓	✓	✓	✓		✓	✓
A(3')CF	✓	✓	✓	✓		✓	✓
A(3')C18		✓			✓	✓	✓
MCHOL			✓			✓	
MC12			✓			✓	
MC14			✓			✓	
MCF			✓			✓	
MC18						✓	
A(5')CHOL						✓	
A(5') espCHOL		✓				✓	
A(5') SS CHOL		✓				✓	
A(5')C12						✓	
A(5')C14						✓	
A(5')CF						✓	
A(5')C18						✓	
Besp CHOL						✓	
BSS CHOL						✓	
BC12		✓	✓	✓		✓	
BC14		✓	✓	✓		✓	
BCF		✓	✓	✓		✓	
CC12		✓	✓			✓	
CC14	✓	✓	✓			✓	
CCF	✓	✓	✓			✓	
DC12		✓	✓	✓		✓	✓
DC14	✓	✓	✓	✓		✓	✓
DCF	✓	✓	✓	✓		✓	✓

Tableau IV.4(B) : Récapitulatif des expériences réalisées sur les analogues de miR-96 amphiphiles (1 : Electrophorèse, 2 : Température de fusion, 3 : Microscopie électronique à transmission, 4 : Microscopie à fluorescence, 5 : microscopie confocale, 6 : Analyse de la régulation post-transcriptionnelle, 7 : Résonance plasmonique de surface)



# PARTIE V : MATERIEL ET METHODES

---

## A. OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS

### I. Oligonucleotides synthesis

Oligonucleotides were synthesized by a classical 3'-5' solid phase method using protected phosphoramidites on an automated Expedite 8909 DNA synthesizer at the  $\mu\text{mol}$  scale on 500 Å primer support (loading: 60-100  $\mu\text{mol/g}$ , Link technologies, Synbase Control Pore Glass) (Figure V.1). We have used commercially available phosphoramidates purchased from Link Technologies (LT), Glen Research (GR) and Baseclick (BC). There were natural nucleic acids (RNA and DNA from LT and GR), chemically modified (2'OMe from LT, LNA from Exiqon, nucleoside-alkyne from BC) and non-nucleoside phosphoramidites (Fluorescein from LT, TAMRA from GR).

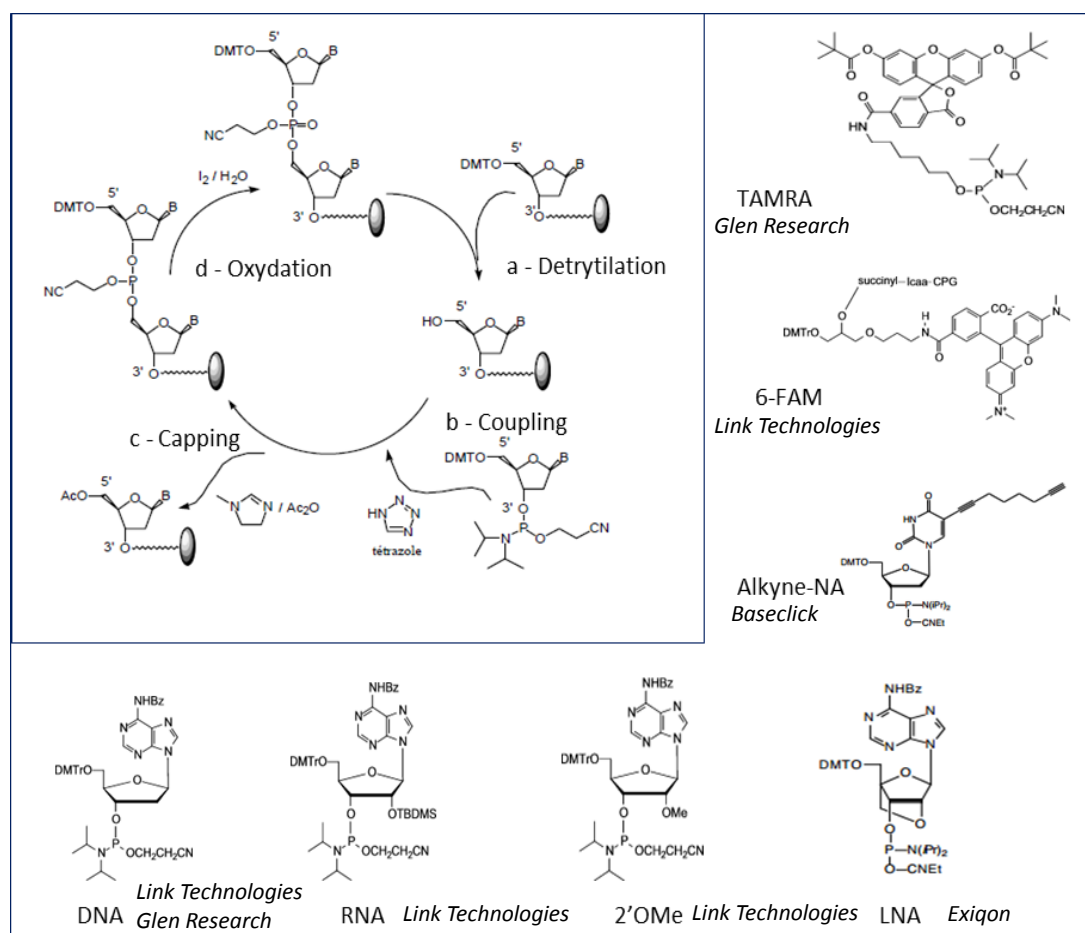


Figure V.1 : Oligonucleotide synthesis and different phosphoramidates.

Oligonucleotides were synthesized by using a classical supported 3'-5' phosphoramidite synthesis according to four step cycles (1. Detritylation, 2. Coupling, 3. Capping, 4. Oxydation).

## II. Amphiphile oligonucleotides synthesis

### 1. Commercially available hydrophobic precursors

The following molecules were purchase from Link Technologies and used for hydrophobic modification of oligonucleotides (Figure V.2).

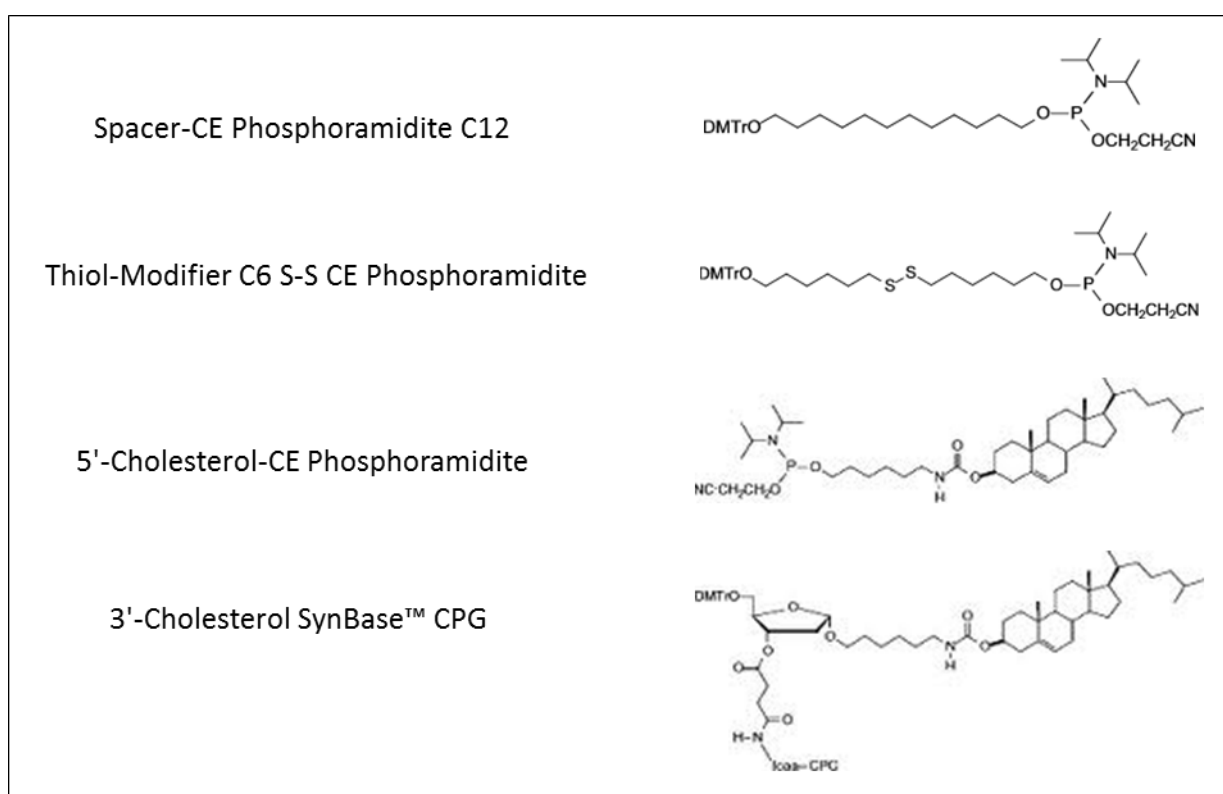


Figure V.2: Hydrophobic modifiers from Link Technologies.

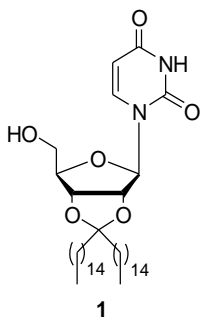
## 2. Hydrophobic precursors synthesis

### 2.1. General Procedures and Materials

All the compounds were purchased from *Sigma-Aldrich*, *Fluka* and *Alfa Aesar* unless otherwise mentioned. Solvents for reactions were purchased from *Sigma-Aldrich* in the highest quality and from *VWR* for other uses. All the reactions were run under nitrogen atmosphere unless otherwise stated. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated silica gel F<sub>254</sub> plates with fluorescent indicator from *Merck*. The detection of compounds was accomplished using a UV light (254 nm) and visualized on TLC plates by subsequent spraying with 10 % conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution in ethanol, followed by heating. Column chromatography was performed with flash silica gel (0.04-0.063 mm) from *Merck*. All the compounds were characterized using <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. These NMR spectra were recorded (in CDCl<sub>3</sub> obtained from *Eurisotop*) on BRUKER Avance DPX-300 spectrometer (<sup>1</sup>H at 300.13 MHz, <sup>13</sup>C at 75.46 MHz and <sup>31</sup>P at 121.49 MHz). The chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) relatively to tetramethylsilane or residual solvent peaks (CHCl<sub>3</sub>: <sup>1</sup>H: 7.26, <sup>13</sup>C: 77.0). The coupling constants *J* are given in Hertz (Hz); the peak multiplicity is reported as follows: s = singlet, bs = broad singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet. High resolution electron spray ionization mass spectra (HR ESI-MS) were performed by the CESAMO (Bordeaux, France) on a QStar Elite mass spectrometer (applied Biosystems). The instrument is equipped with an ESI source and spectra were recorded in negative mode. The electrospray needle was maintained at 4500 V and operated at room temperature. Samples were introduced by introduced by injection through a 10  $\mu$ L sample loop into a 200  $\mu$ L/min flow of methanol from the LC pump. For oligonucleotides, MALDI-TOF mass spectra were performed by Katell Batany (Bordeaux, France) on a Voyager mass spectrometer (applied Biosystems). It is equipped with a nitrogen laser (337nm, 3 ns pulse, 20 Hz maximum firing rate) and with a post-source-decay equipment.

## 2.2. Synthesis of phosphoramidite **2**

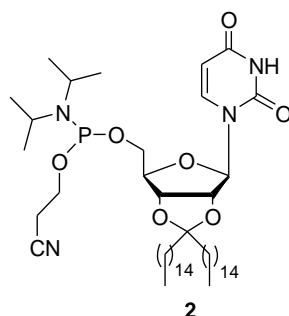
### 2',3'-O-16-hentriacontanylidenuridine **1**



Palmitone (1 g, 2.22 mmol, 1 eq) was added to a mixture of dry THF (20 mL), uridine (2.70 g, 11.11 mmol, 5 eq), TsOH (420 mg, 2.22 mmol, 1 eq) and triethylorthoformate (1.85 mL, 11.11 mmol, 5 eq). The solution was refluxed for 1 day, quenched with TEA (0.60 mL) and poured into a solution of H<sub>2</sub>O (50 mL), ice (50 g) and NaHCO<sub>3</sub> (4 g). After stirring for 15 min, the organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. MeOH was added and the product was filtered to give compound **1** (0.74 g, 49 %) as a white powder. <sup>1</sup>H NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.87 (t, *J* = 6.6 Hz, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 1.24 (m, 48 H, 24 CH<sub>2</sub>), 1.41 (m, 4 H, 2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.56 (m, 2 H, CCH<sub>2</sub>), 1.73 (m, 2 H, CCH<sub>2</sub>), 3.05 (m, 1 H, OH), 3.80 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H, H5'), 3.91 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1 H, H5'), 4.28 (m, 1 H, H4'), 4.95 (dd, *J* = 6.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H, H3'), 5.04 (dd, *J* = 6.6 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1 H, H2'), 5.55 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, H1'), 5.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, CH), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, CH), 9.43 (m, 1 H, NH). <sup>13</sup>C NMR (75.47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 14,10 (CH<sub>3</sub>), 22.70 (CH<sub>2</sub>), 23.54 (CH<sub>2</sub>), 24.15 (CH<sub>2</sub>), 29.33-29.81 (CH<sub>2</sub>), 31.89 (CH<sub>2</sub>), 36.85 (CH<sub>2</sub>COO), 36.98 (CH<sub>2</sub>COO), 62.65 (C5'), 80.29 (C4'), 83.84 (C3'), 87.29 (C2'), 96.34 (C1'), 102.56 (CH), 118.39 (OCO), 143.16 (CH), 150.32 (CO), 163.33 (CO). FAB mass spectrometry (MH)<sup>+</sup> = 677.)



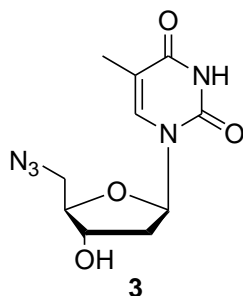
2',3'-O-16-hentriacontanyliden-5'-(cyanoethyl)diisopropylphosphoramidite  
uridine **2**



Compound **1** was dried over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> overnight under reduced pressure before use. Diisopropylethylamine (0.052 mL, 0.299 mmol, 2eq), **1** (97mg, 0.149 mmol, 1eq) and 2-Cyanoethyl N,N-diisopropylchlorophosphoramidite were dissolved in 3 mL of DCM and the solution stirred at room temperature for 1h. Sodium bicarbonate 0.1M (3 mL) was poured into the flask and the aqueous phase extracted with DCM. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. Flash chromatography (Hex/AcOEt/TEA 70/25/5) afforded 90 mg (69%) of the desired phosphoramidite **2** as a white solid. <sup>1</sup>H NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6 H, 2CH<sub>3</sub>), 1.19 (m, 12H, iPr), 1.27 (m, 50H, 25 CH<sub>2</sub>), 1.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.65 (m, 2H, iPr), 3.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 3.85 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>, H5'), 4.36 (m, 1H, H4'), 4.83 (m, 2H, H2',3'), 5.72 (d, J = 8.1 Hz, 1H, CH), 5.81 (s, 1H, H1', dia1), 5.90 (s, 0.5H, H1', dia2), 7.48 (d, J = 8.1 Hz, 0.5H, CH, dia1), 7.57 (d, J = 8.1 Hz, 0.5H, CH, dia2). ESI MS ([M-H]<sup>-</sup> = 876).

### 2.3. Azides synthesis

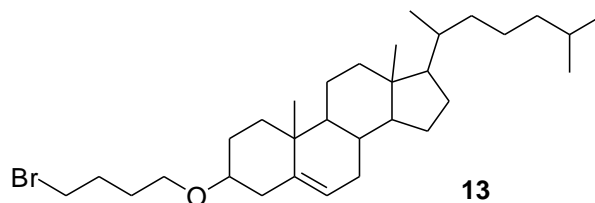
#### 5'-azido-5'-deoxythymidine **3**



Dried pyridine (20 mL) was added to thymidine (500 mg, 2.06 mmol, 1 eq). The mixture was cooled to 0 °C and methylsulfonyl chloride (284 mg, 2.07 mmol, 1.05 eq) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residual compound was used directly without further purification in the following step. DMF (40 mL) and sodium azide (669 mg, 10.3 mmol, 5 eq) was added. The reaction mixture was maintained at 80 °C under stirring for 4 hours. The DMF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 50 mL of AcOEt and was washed successively twice with NaHCO<sub>3</sub> 5% in H<sub>2</sub>O (20 mL) and once with brine (20 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. 330 mg of product **3** was isolated after precipitation (MeOH/acetonitrile), (Yield: 60 %). R<sub>f</sub>: 0,47 (ethyl acetate/methanol, 9/1). The data agreed with the literature values. ([J. Hiebl and al, J. Med. Chem., 1991, 34,1426](#))

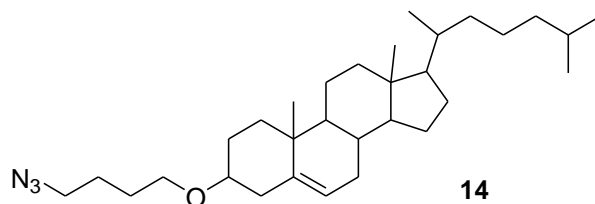
## Synthesis of azido cholesterol **14**

### Synthesis of bromo derivative cholesterol **13**



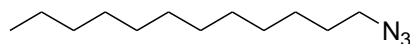
Anhydrous THF (15 mL) was added under nitrogen to cholesterol (1 g, 2.59 mmol, 1 eq). The mixture was cooled to 0 °C and NaH (155 mg (60 % in oil), 3.88 mmol, 1.5 eq) was added by small portion. 1,4-dibromobutane (5.58 g, 25.9 mmol, 10 eq) was then added at room temperature. The reaction mixture was maintained at 50 °C under stirring for 24 hours. The reaction was stopped by addition of methanol (5 mL). The THF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 50 mL DCM and washed successively twice with water (20 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **13** was isolated after purification on silica gel (Ethyl acetate:Hexane from 3:97 to 5: 95). Yield: 718 mg (53.2 %). R<sub>f</sub>: 0.5 (Ethyl acetate:Hexane 5:95). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (19)), 0.85-0.87 (d, *J*=6.6 Hz, 6H, 2CH<sub>3</sub>(side chain)), 0.90-0.93 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>(side chain)), 1.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (18)), 1.02-2.07 (m, 30H, cholesterol and side chain), 2.13-2.38 (m, 2H, OCH-CH<sub>2</sub>-C=CH), 3.07-3.18 (m, 1H, O-CH), 3.42-3.51 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Br), 5.34 (d, *J*=5.08 Hz, 1H, CH=C).

## Synthesis of azido derivative cholesterol **14**



Dried DMF (20 mL) and sodium azide (1.86 g, 28.75 mmol, 6 eq) was added to **13** (2.5 g, 4.792 mmol, 1 eq). The reaction mixture was maintained at 80 °C under stirring for 24 hours. The DMF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 100 mL of ethyl acetate and was washed successively twice with NaHCO<sub>3</sub> (5 % in water, 20 mL) and once with brine (20 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **14** was isolated after purification on silica gel (Ethyl acetate:Hexane from 1:99 to 5:95). Yield: 1.35 g (58.5 %). R<sub>f</sub>: 0.35 (Ethyl acetate:Hexane 3:97). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (19)), 0.85-0.87 (d, *J*=6.6 Hz, 6H, 2CH<sub>3</sub>(side chain)), 0.90-0.92 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>(side chain)), 1.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (18)), 1.02-2.03 (m, 30H, cholesterol and side chain), 2.13-2.38 (m, 2H, OCH-CH<sub>2</sub>-C=CH), 3.07-3.18 (m, 1H, O-CH), 3.30 (t, 2H, *J*=6.59 Hz, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.48 (t, 2H, *J*=5.75 Hz, O-CH<sub>2</sub>), 5.34 (d, *J*=5.08 Hz, 1H,CH=C). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 11.8 (CH<sub>3</sub>(19)), 18.7 (CH<sub>3</sub>(18)), 19.3 (CH<sub>3</sub>(21)), 21.0, 22.5 (CH<sub>3</sub>(26)), 22.8 (CH<sub>3</sub>(27)), 23.8, 24.2, 25.9, 27.3, 28.0, 28.2, 28.4, 31.8, 31.9, 35.7, 36.1, 36.8, 37.2, 39.1, 39.5, 39.7, 42.3, 50.1, 51.3 (-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 56.1, 56.7, 67.2 (-CH<sub>2</sub>-O-), 79.0 (-O-CH-), 121.5 (-C=CH), 140.9 (-C=CH).

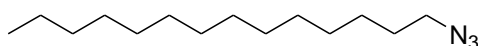
### Synthesis of 1-azidododecane **15**



**15**

Dried DMF (15 mL) and sodium azide (0.782 g, 12.03 mmol, 3 eq) was added to 1-bromododecane (1.0 g, 4.012 mmol, 1 eq). The reaction mixture was maintained at 80 °C under stirring for 24 hours. The contents were allowed to cool to room temperature and were dissolved in 100 mL of ethyl acetate and was washed successively thrice with water (25 mL) and once with brine (25 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure (Rotavapour, max. 45 °C). The crude product (oil) **15** was isolated after purification on silica gel (Hexane). Yield: 820 mg (96.6 %). R<sub>f</sub>: 0.7 (Hexane). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.88 (t, 3H, *J*=6.69 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.26 (s, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 1.55-1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.25 (t, 2H, *J*=6.87 Hz, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 14.0 (-CH<sub>3</sub>), 22.6 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 26.7 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.8-29.6 (-CH<sub>2</sub>- of chains), 31.9 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 51.4 (-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>).

### Synthesis of 1-azidotetradecane **16**

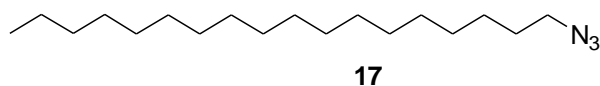


**16**

Dried DMF (15 mL) and sodium azide (0.703 g, 10.81 mmol, 3eq) was added to 1-bromotetradecane (1.0 g, 3.60 mmol, 1eq). The reaction mixture was maintained at 80 °C under stirring for 24 hours. The contents were allowed to cool to room temperature and were dissolved in 100 mL of ethyl acetate and were washed successively twice with water (25 mL) and once with brine (25 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure (Rotavapour, max. 45 °C). The crude product (oil) **16** was isolated after purification on silica gel (Hexane). Yield: 850 mg (98.5 %). R<sub>f</sub>: 0.7 (Hexane). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.88 (t, 3H, *J*=6.69 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.26 (s, 22H, 11CH<sub>2</sub>), 1.55-1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.25 (t, 2H,

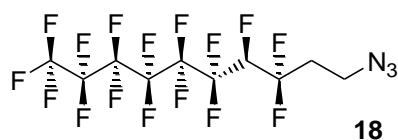
$J=6.97$  Hz,  $\underline{CH_2-N_3}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  in ppm 14.1 ( $-\text{CH}_3$ ), 22.7 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_3}$ ), 26.7 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3}$ ), 28.8-29.6 ( $-\text{CH}_2-$  of chains), 31.9 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3}$ ), 51.4 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{N}_3}$ ).

### Synthesis of 1-azidooctadecane **17**



Dried DMF (20 mL) and sodium azide (1.17 g, 18 mmol, 3 eq) was added to 1-bromooctadecane (2.0 g, 6 mmol, 1 eq). The reaction mixture was maintained at 80 °C under stirring for 24 hours. The DMF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 100 mL of ethyl acetate and was washed successively twice with  $\text{NaHCO}_3$  (5 % in water, 20 mL) and once with brine (20 mL). The organic phase was dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated under reduced pressure. Product **17** was isolated after purification on silica gel (EtOAc:Hexane 2:98). Yield: 1.45 g (81.7 %).  $R_f$ : 0.7 (Ethyl acetate:Hexane 2:98).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  in ppm 0.88 (t, 3H,  $J=6.69$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.26 (s, 30H, 11 $\text{CH}_2$ ), 1.54-1.64 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3}$ ), 3.25 (t, 2H,  $J=6.97$  Hz,  $\underline{\text{CH}_2-\text{N}_3}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  in ppm 14.2 ( $-\text{CH}_3$ ), 22.6 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_3}$ ), 26.7 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3}$ ), 28.8-29.6 ( $-\text{CH}_2-$  of chains), 31.9 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3}$ ), 51.4 ( $-\underline{\text{CH}_2-\text{N}_3}$ ).

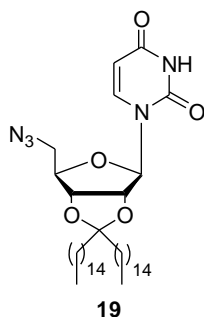
### Synthesis of heptadecafluoro-10-azidodecane **18**



Dried DMF (15 mL) and sodium azide (170 mg, 2.61 mmol, 3 eq) was added to 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluoro-10-iododecane (500 mg, 0.871 mmol, 1 eq). The reaction mixture was maintained at 80 °C under stirring for 24 hours. The contents were allowed to cool to room temperature

and were dissolved in 100 mL of EtOAc and were washed successively twice with water (25 mL) and once with brine (25 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure (Rotavapour, max. 45 °C). The crude product (oil) **18** was isolated after purification on silica gel (EtOAc:Hexane 1:99). Yield: 342 mg (80.3 %). *R<sub>f</sub>*: 0.6 (EtOAc:Hexane 1:99). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 2.31-2.38 (m, 2H, -CF<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.62 (t, *J*=7.25 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 30.7 (-CH<sub>2</sub>-CF<sub>2</sub>), 43.3 (-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 106.2-122.9 (CF<sub>3</sub> and 7 CF<sub>2</sub>).

### 2',3'-O-16-hentriacontanyliden-5'-azidouridine **19**

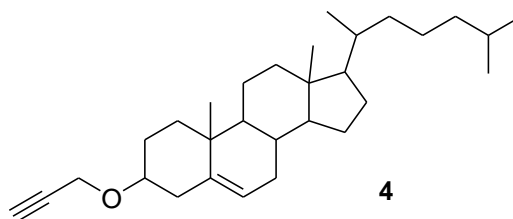


Dried pyridine (15 mL) was added to 2',3'-O-16-hentriacontanylidenuridine **1** (520 mg, 0.77 mmol, 1 eq). The mixture was cooled to 0 °C and methanesulfonyl chloride (114.5 mg, 1.0 mmol, 1.3 eq) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residual compound was used directly without further purification in the following step. DMF (20 mL) and sodium azide (250 mg, 3.84 mmol, 5 eq) were added. The reaction mixture was maintained at 80 °C under stirring for 4 hours. The DMF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 50 mL of ethyl acetate and was washed successively twice with NaHCO<sub>3</sub> (5 % in water, 5 mL) and once with brine (5 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **19** was isolated after purification on silica gel (EtOAc/Hexane/TEA 29/70/1). Yield: 304 mg (56.5 %). *R<sub>f</sub>*: 0.5 (EtOAc/Hexane/TEA 29/70/1). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.87 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz, 2CH<sub>3</sub> of chain), 1.24 (s, 52H, 26CH<sub>2</sub> of chain), 1.49-1.74 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub> (chain)), 3.56-3.84 (m, 2H, 2H5'), 4.23-4.28 (s, 1H, H2'), 4.79-4.82 (m, 1H, H3'), 4.99-5.02 (m, 1H, H4'), 5.62 (d, 1H,

$J = 1.9$  Hz, H1'), 5.78 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-5(base)), 7.29 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-6(base)), 9.48 (s, 1H, -NH(base)).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  in ppm 14.1 ( $\text{CH}_3$  chain), 22.7 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  chain), 23.4 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-}$ ), 24.1 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-}$ ), 29.3-29.8 ( $\text{CH}_2$  chain), 31.9 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$  chain), 36.9 ( $\text{CH}_2\text{-C-CH}_2$ ), 52.4 (C5'-sugar), 81.7 (C3'-sugar), 84.5 (C4'-sugar), 86.2 (C2'-sugar), 95.4 (C1'-sugar), 102.8 (C5-base), 118.7 (C, ketal), 142.8 (C6-base), 150.0 (C=O(2) base), 163.6 (C=O(4) base). High-resolution ESI MS  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , theoretical  $m/z = 724.5347$ , observed  $m/z = 724.5357$ .

## 2.4. Alkyne synthesis

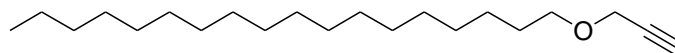
### Cholesteryl-propargylether 4



Anhydrous THF (50 mL) was added under nitrogen to cholesterol (5 g, 12.4 mmol, 1 eq). The mixture was cooled to 0 °C and NaH (446.4 mg, 18.6 mmol, 1.5 eq) was added by small portion. Propargylbromide (1.84 g, 15.5 mmol, 1.25 eq) was then added at room temperature. The reaction mixture was maintained at 50 °C under stirring for 24 hours. The reaction was stopped by addition of methanol (10 mL). The THF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 50 mL of DCM and was washed successively twice with water (20 mL) and once with brine (20 mL). The organic phase was dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated under reduced pressure. 1.84 g of product **4** was isolated after chromatography (Hexane/EtOAc 8/2), (Yield: 36 %).  $R_f$ : 0.79 (Hexane/EtOAc 8/2). The data agreed with the literature values (Ohkubo, M. and al *Org. Lett.* 2007, 9, 773-776).



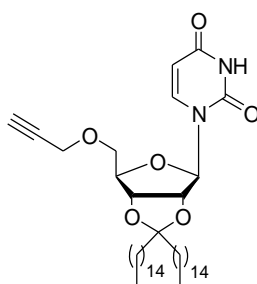
### Octadecyl-propargylether 5



5

Anhydrous DMF (25 mL) was added under nitrogen to propargyl alcohol (673 mg, 12 mmol, 2 eq). The mixture was cooled to 0°C and NaH (216 mg, 9 mmol, 1.5 eq) was added by small portion. Octadecylbromide (2 g, 6 mmol, 1 eq) was then added at room temperature. The reaction mixture was maintained at 70 °C under stirring for 10 hours. The reaction was stopped by addition of methanol (10 mL). The DMF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 50 mL of DCM and was washed successively twice with water (20 mL) and once with brine (20 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. 1.2 g of product was isolated after chromatography (100 % hexane), (Yield: 65 %). R<sub>f</sub>: 0.82 (Hexane). The data agreed with the literature values (Rosensthal, A. F. and al *Recueil des travaux chimiques des Pays Bas* 1964, 83, 1273-1287).

### 2',3'-O-16-hentriacontanyliden-5'-O-propargyluridine 6



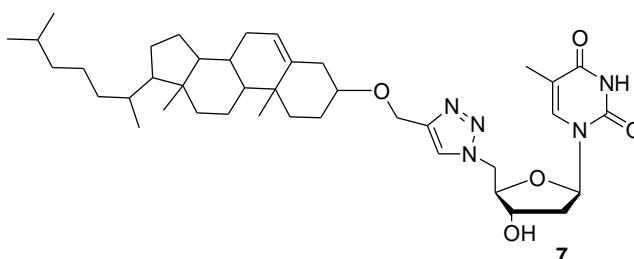
6

Anhydrous THF (10 mL) was added under nitrogen to 2',3'-O-16-hentriacontanylidenuridine **1** (677 mg, 1 mmol, 1 eq). The mixture was cooled to 0 °C and NaH (36 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) was added. Propargyl bromide (148.7 mg, 1.25 mmol, 1.25 eq) was then added at room temperature. The reaction mixture was maintained at 50 °C under stirring for 24 hours. The reaction was stopped by addition of MeOH (1 mL). The THF was removed under reduced pressure. The residual solid was dissolved in 25

mL of DCM and was washed successively twice with H<sub>2</sub>O (5 mL) and once with brine (10 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **6** was isolated after purification on silica gel (EtOAc/Hexane/TEA from 19/80/1 to 29/70/1). Yield: 445 mg (62.2 %). R<sub>f</sub>: 0.43 (EtOAc/Hexane/TEA 29:270:1). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.86 (t, 6 H, *J* = 6.9 Hz, 2 CH<sub>3</sub> of chain), 1.24 (s, 52 H, 26 CH<sub>2</sub> of chain), 1.52-1.75 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub> (chain)), 2.46 (t, 1 H, *J* = 2.3 Hz, -C'CH), 3.69-3.88 (m, 2 H, 2 H5'), 4.17 (t, 2 H, *J* = 2.7 Hz CH<sub>2</sub>-C'), 4.37-4.40 (s, 1 H, H2'), 4.78-4.85 (m, 2 H, H4', H3'), 5.69 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, H-5(base)), 5.82 (s, 1H, H1'), 7.48 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, H-6(base)), 9.81 (s, 1H, -NH(base)). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 14.1 (CH<sub>3</sub> chain), 22.6 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> chain), 23.4 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-), 24.1 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-), 29.3-29.8 (CH<sub>2</sub> chain), 31.6 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> chain), 36.9 (CH<sub>2</sub>-C- CH<sub>2</sub>), 58.5 (CH<sub>2</sub>-C'), 69.9 (C5'-sugar), 75.2 -C'CH), 78.7 (-C'CH), 81.1 (C3'-sugar), 85.1 (C4'-sugar), 86.0 (C2'-sugar), 93.7 (C1'-sugar), 102.1 (C5-base), 118.0 (C, ketal), 141.8 (C6-base), 150.1 (C=O(2) base), 163.8 (C=O(4) base). High-resolution ESI MS [M+Na]<sup>+</sup> theoretical *m/z* = 737.5439, observed *m/z* = 737.5454.

## 2.5. Click reaction in pre-synthesis strategy

1-(((cholesteryloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-tetrahydro-4 hydroxyfuran-2-yl)-5-thymine **7**

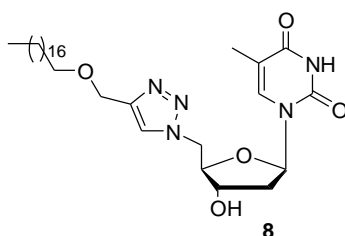


Cholesteryl-propargylether **4** (270 mg, 0.64 mmol, 1 eq), potassium ascorbate (2.6 mg, 0.013 mmol, 0.02 eq) and copper sulfate (1 mg, 0.006 mmol, 0.01 eq) was added to 5'-azido-5'-deoxythymidine **3** (170 mg, 0.64 mmol, 1 eq) in a water/THF mixture (50/50) (0.2M). The reaction mixture was maintained at 65 °C under stirring for 10 hours. The mixture was cooled to room

temperature and the solvent was evaporated. The residual solid was dissolved in DCM (100 mL) and successively washed by water (2 X 20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was then dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure.

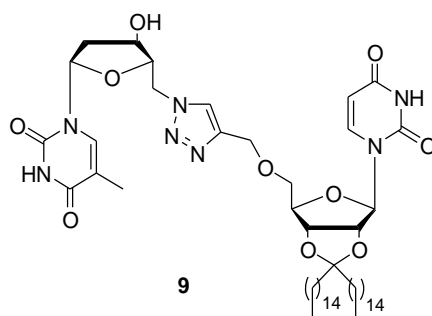
260 mg of product **7** was isolated after chromatography (EtOAc/methanol 8/2), (Yield: 59 %). R<sub>f</sub>: 0.57 (EtOAc/methanol 8/2) 9

1-((2R,4R,5R)-tetrahydro-4-hydroxy-5-((4-((octadecyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)furan-2-yl)-5-thymine **8**



Octadecyl-propargylether **5** (230 mg, 0.75 mmol, 1 eq), potassium ascorbate (3 mg, 0.015 mmol, 0.02 eq) and copper sulfate (1 mg, 0.007 mmol, 0.01 eq) was added to 5'-azido-5'-deoxythymidine **3** (200 mg, 0.75 mmol, 1 eq) in a water/THF mixture (50/50) (0.2 M). The reaction mixture was maintained at 65 °C under stirring for 10 hours. The mixture was cooled to room temperature and the solvent was evaporated. The residual solid was dissolved in DCM (100 mL) and successively washed by water (2 X 20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was then dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. 180 mg of product **8** was isolated after chromatography (ethyl acetate/methanol 8/2), (Yield: 42 %). R<sub>f</sub>: 0.72 (ethyl acetate/methanol 8/2). The data agreed with the literature values (G. Godeau, C. Staedel and P.J. Barthélémy, *J Med Chem.*, 2008, 51, 4374.).

1-((2R,4S,5R)-5-(((5-((((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dipentadecyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione **9**

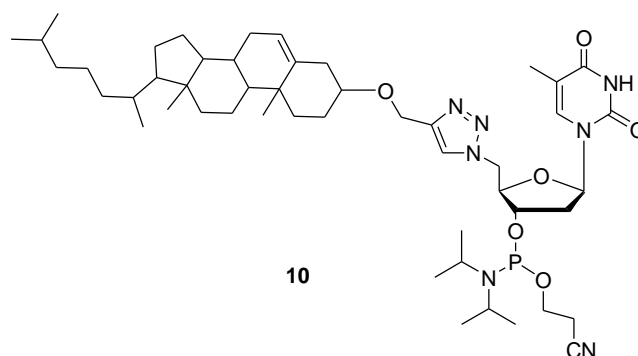


2',3'-O-16-hentriacontanyliden-5'-O-propargyluridine **6** (445 mg, 0.63 mmol, 1 eq), sodium ascorbate (25 mg, 0.13 mmol, 0.2 eq) and copper sulfate (10 mg, 0.063 mmol (10%)) was added to 5'-azido-5'-deoxythymidine **3** (167 mg, 0.63 mmol, 1 eq) in water/THF mixture (1:1) (20 mL). The reaction mixture was maintained at 65 °C under stirring for 10 hours. The mixture was cooled to room temperature and the solvent was evaporated. The residual solid was dissolved in DCM (100 mL) and was washed successively twice with water (20 mL) and once with brine (20 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **9** was isolated after purification on silica gel (MeOH/EtOAc/TEA 6/93/1). Yield: 480 mg (78.5 %). R<sub>f</sub>: 0.32 (MeOH/EtOAc/TEA 6/93/1). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.87 (t, 6H, *J* = 6.5 Hz, 2CH<sub>3</sub> of chain), 1.25 (s, 52H, 26CH<sub>2</sub> of chain), 1.48-1.78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub> (chain)), 1.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-thymine base), 2.31-2.54 (m, 2H, H2'' (sugar of thymidine)), 3.68-3.82 (m, 2H, H5' (sugar of uridine)), 4.18-4.85 (m, 10H, -O-CH<sub>2</sub>, H2', H3', H4', H3'', H4'', H5'', -OH ), 5.55 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-5(uracil base)), 5.77 (s, 1H, H1' (sugar of uridine)), 6.06 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, H1'' (sugar of thymidine)), 6.97 (s, 1H, triazole), 7.47 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-6(uracil base), 7.70 (s, 1H, H-6(thymine base), 9.79 (s, 1H, -NH(uracil base)), 10.08 (s, 1H, -NH(thymine base)). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 12.3 (CH<sub>3</sub> base), 14.0 (CH<sub>3</sub> chain), 22.6 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> chain),

23.4 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-}$ ), 24.1 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-}$ ), 29.3-29.6 ( $\text{CH}_2$  chain), 31.8 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$  chain), 36.9 ( $\text{CH}_2\text{-C-CH}_2$ ), 38.4 ( $\text{C}2''$ ), 51.5 ( $\text{C}5''$ ), 64.3 ( $-\text{O-CH}_2$ ), 70.4 ( $\text{C}3''$ ), 71.4 ( $\text{C}5'$ ), 81.0 ( $\text{C}4''$ ), 84.1 ( $\text{C}3'$ ), 85.1 ( $\text{C}4'$ ), 86.3 ( $\text{C}2'$ ), 86.8 ( $\text{C}1''$ ), 93.9 ( $\text{C}1'$ ), 101.4 ( $\text{C}5\text{-thymine base}$ ), 111.1 ( $\text{C}5\text{-uracil base}$ ), 117.7 ( $\text{C}$ , ketal), 124.5 ( $-\text{CH}$  triazole), 137.2 ( $\text{C}6\text{-thymine base}$ ), 142.3 ( $\text{C}6\text{-uracil base}$ ), 143.8 ( $=\text{C-}$  triazole), 150.2 ( $\text{C}=\text{O}(2)$  uracil base), 150.8 ( $\text{C}=\text{O}(2)$  thymine base), 164.3 ( $\text{C}=\text{O}(4)$  thymine base), 164.6 ( $\text{C}=\text{O}(4)$  uracil base). High-resolution ESI MS  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , theoretical  $m/z = 982.6587$ , observed  $m/z = 982.6613$ .

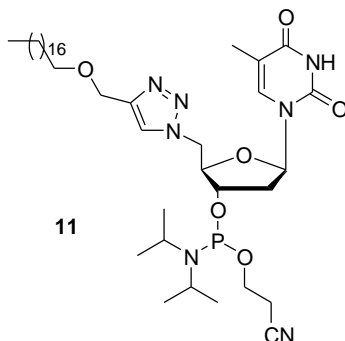
## 2.6. Synthesis of phosphoramidites

1-((((cholesteryloxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3-O(2-cyanoethoxy (diisopropylamino)-phosphino)-tetrahydro-4-hydroxyfuran-2-yl)-5-thymine  
**10**



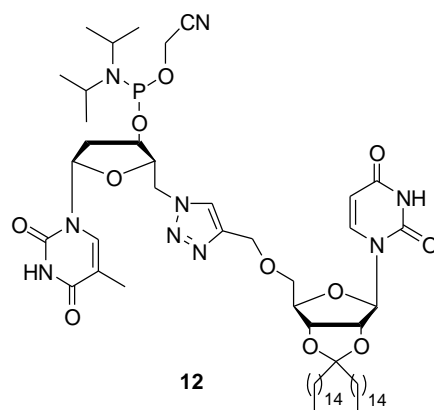
Under nitrogen, freshly distilled DIEA (26 mg, 0.2 mmol, 2 eq), 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (35.5 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq) was added to nucleolipid **7** (70 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (0.02M). The reaction mixture was maintained at room temperature under stirring for 6 hours. DCM (5 mL) was added and the mixture was successively washed by  $\text{NaHCO}_3$  5 % in water (2 X 2 mL) and brine (2 mL). The organic layer was then dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated under reduced pressure. 59 mg of product **10** was isolated after chromatography (Hexane/EtOAc 2/8), (Yield: 65%). R<sub>f</sub>: 0.53 (Hexane/EtOAc 2/8) NMR 31P (121.49 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 152.3 and 152.5. HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : Calcd for 892.5829, found 892.5786.

1-(((Octadecyloxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3-O(2-cyanoethoxy(diisopropylamino)-phosphino)-tetrahydro-4-hydroxyfuran-2-yl)-5-thymine **11**



Under nitrogen, freshly distilled DIEA (44 mg, 0.34 mmol, 2 eq), 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (60 mg, 0.25 mmol, 1.5 eq) was added to nucleolipid **8** (100mg, 0.17 mmol, 1 eq) in anhydrous DCM (0.02M). The reaction mixture was maintained at room temperature under stirring for 6 hours. DCM (5 mL) was added and the mixture was successively washed by NaHCO<sub>3</sub> 5 % in water (2 X 2 mL) and brine (2 mL). The organic layer was then dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. 65 mg of product **11** was isolated after chromatography (Hexane/ethyl acetate 3/7), (Yield: 49 %). R<sub>f</sub>: 0.52 (Hexane/ethyl acetate 3/7) NMR 31P (121.49 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 152.1 and 152.3. HRMS [M+H]<sup>+</sup>: Calcd for 776.5203, found 776.5184

2-cyanoethyl 2R,3S,5R)-2-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dipentadecyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl diisopropylphosphoramidite **12**



Under argon, freshly distilled DIPEA (127 mg, 0.98 mmol, 2 eq), 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (174 mg, 0.74 mmol, 1.5 eq) was added to nucleolipid **9** (480 mg, 0.49 mmol, 1 eq) in dry DCM (10 mL). The reaction mixture was maintained at room temperature under stirring for 6 hours. DCM (5 mL) was added and the mixture was washed successively twice with NaHCO<sub>3</sub> (5 % in water, 5 mL) and once with brine (5 mL). The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **12** was isolated after purification on silica gel (EtOAc/Hexane/TEA 69/30/1). Yield: 313 mg (54.4 %). *R<sub>f</sub>*: 0.28 (EtOAc/Hexane/TEA 59/40/1). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 0.85 (t, 6H, *J* = 6.4 Hz, 2CH<sub>3</sub> of chain), 1.17-1.19 (d, *J* = 6.6 Hz, 12H, 4CH<sub>3</sub> of isopropyl group), 1.22 (s, 52H, 26CH<sub>2</sub> of chain), 1.46-1.77 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub> (chain)), 1.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-thymine base), 2.33-2.80 (m, 6H, 2H of two isopropyl group, 2H of CH<sub>2</sub>-CN, 2H<sup>2''</sup> (sugar of thymidine)), 3.39-3.68 (m, 4H, 2H -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, 2H<sup>5'</sup> (sugar of uridine)), 4.19-4.87 (m, 9H, -O-CH<sub>2</sub>, H<sup>2'</sup>, H<sup>3'</sup>, H<sup>4'</sup>, H<sup>3''</sup>, H<sup>4''</sup>, H<sup>5''</sup>), 5.61 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-5(uracil base)), 5.85 (s, 1H, H<sup>1'</sup> (sugar of uridine)), 6.00-6.11 (m, 1H, H<sup>1''</sup> (sugar of thymidine)), 6.94 (s, 1H, triazole), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-6(uracil base), 7.68 (s, 1H, H-6(thymine base). <sup>31</sup>P NMR (121.49 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm 152.3 (d, P).

High-resolution ESI MS  $[M+Na]^+$ , theoretical  $m/z = 1204.7485$ , observed  $m/z = 1204.7516$ .

### **3. Coupling on Oligonucleotide sequence**

#### **3.1. Pre-synthesis strategy with modified phosphoramidites**

Synthesized modified phosphoramidates were manually coupled last on the solid support by passing (via syringes) the activator and the phosphoramidite (0.25 mL) back and forth several times for 7 min. Prior to use, the phosphoramidites were co-evaporated several times with ACN, and dissolved in dry DCM/ACN 2/1 to a 0.06 M concentration. N benzylthiotetrazole was used for activation of phosphoramidates.

#### **3.2. Post-synthesis strategy with 1,3-dipolar cyclo-addition**

Oligonucleotide sequences bearing alkyne moieties at desired position (3', 5' termini or internal position) were synthesized using the standard solid phase synthesis with commercially available phosphoramidites.

##### *➤ on solid support with micro-wave activation*

To a 500 nmol solid-supported alkyne-oligonucleotide was added a mixture of an azide (30 eq by alkyne, 300  $\mu$ L of a 50 mM solution in THF), a freshly prepared  $CuSO_4$  solution (2.5 eq, 25  $\mu$ L of a 50mM solution in  $H_2O$ ), a freshly prepared sodium ascorbate solution (30 eq, 300  $\mu$ L of a 50 mM solution in  $H_2O$ ). A mixture of Water/MeOH/THF (2:2:1 v/v) was then added to obtain a total volume of 2000  $\mu$ L. The resulting preparation was heated in a sealed glass tube in a CEM Discover-SP apparatus at a 100 W and a 30 s premixing time. The temperature was monitored with an internal infrared probe and held at 60°C over 45 min. The reaction mixture was then centrifuged to remove the supernatant. The beads were washed 2 times with MeOH/THF (1: 1) and 2 times with a solution of EDTA at 50 mM.



➤ in solution with micro-wave activation

The reaction was carried out with alkyne-oligonucleotides in solution, after deprotection and purification steps. To a 20 nmol of alkyne-oligonucleotide was added a mixture of an azide (7.5 eq by alkyne, 3  $\mu$ L of a 50 mM solution in THF), a freshly prepared CuSO<sub>4</sub> solution (0.63 eq, 2.5  $\mu$ L of a 50 mM solution in H<sub>2</sub>O), a freshly prepared sodium ascorbate solution (7.5 eq, 3  $\mu$ L of a 50 mM solution in H<sub>2</sub>O). A mixture of Water/MeOH/THF (2:2:1 v/v) was then added to obtain a total volume of 500  $\mu$ L. The resulting preparation was heated in a sealed glass tube in a CEM Discover-SP apparatus at a 100 W and a 30 s premixing time. The temperature was monitored with an internal infrared probe and held at 60° C over 45 min. The reaction mixture was evaporated using the SpeedVac to near-dryness and dissolved in 200  $\mu$ L of milli Q water.

➤ in solution

The reaction is carried out with alkyne-oligonucleotides in solution, after deprotection and purification steps. To 20 nmol Alkyne-oligonucleotides was added the azide (7.5 eq by alkyne, 3  $\mu$ L of a 50 mM solution in THF). In a separate vial, a CuBr solution (17  $\mu$ L, 100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) and a TBTA solution (34  $\mu$ L, 100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) were vortexed and added to the first vial containing oligonucleotide and azide partners. The solution was shaken at 60 °C for 24 hours, evaporated to near-dryness in a SpeedVac and dissolved in 200  $\mu$ L of autoclaved milli-Q water.

After synthesis, all oligonucleotides were cleaved from the solid support and submitted to deprotection steps.

### **III. Oligonucleotide deprotection**

#### **1. 2'OMe, LNA/DNA**

Bases deprotection and cleavage from the solid support was achieved by using 1 mL of a saturated aqueous NH<sub>4</sub>OH solution for 5 hours at 65°C. The

supernatant was collected and the CPG beads were washed 3 times with 0.25 mL of EtOH/ACN/H<sub>2</sub>O 3/1/1 (vol). The solutions were pooled and evaporated (SpeedVac).

## **2. RNA**

Bases deprotection and cleavage from the solid support was achieved by using 1 mL of a saturated aqueous NH<sub>4</sub>OH/EtOH 3/1 (vol/vol) solution for 12 hours at 55°C. The supernatant was collected and the CPG beads were washed 3 times with 0.25 mL of EtOH/ACN/H<sub>2</sub>O 3/1/1 (vol). The solutions were pooled and evaporated (Speed Vac). For RNA there is an additional deprotection step of the 2' position, carried out by the following mixture (120 μL of N-methylpyrrolidinone, 60 μL of TEA and 80 μL of TEA.3HF) at 65°C for 1.5 hour. Then the solution of the deprotected oligonucleotide was mixed with 1 mL of n-butanol in an Eppendorf tube, vortexed for 15 sec, and centrifuged for 1 min. The H<sub>2</sub>O-containing butanol is removed and discarded. The pellet is dissolved in 100 μL of H<sub>2</sub>O and re-extracted with butanol as above. The pellet is dried (SpeedVac) and suspended in 200 μL of autoclaved milli-Q water.

## **3. TAMRA support**

The TAMRA support required ultra mild deprotection conditions using 1 mL of a solution at 50 mM potassium carbonate in anhydrous MeOH. After 4 hours at room temperature, the methanolic potassium carbonate ions were neutralized with 6 μL of AcOH. The supernatant was collected and evaporated (SpeedVac).

After cleavage from the support and deprotection, oligonucleotides were purified

## IV. Oligonucleotide Purification

### 1. HPLC

#### ➤ oligonucleotides

Crude oligonucleotides, dissolved in 200  $\mu$ L of water, were purified on a semi-preparative C18-reverse phase HPLC by using a linear gradient of 0 to 30 % B over 35 min at a flow rate of 5 mL/min (buffer A: 0.1M TEAA, pH7, 5% ACN; buffer B: 0.1M TEAA, pH7, 80 % ACN). Oligonucleotides were eluted after around 15 min. Product containing fractions were pooled and evaporated to dryness and dissolved in autoclaved milli-Q water.

#### ➤ ONA

Crude ONA, dissolved in 200  $\mu$ L of water, were purified on a semi-preparative C4-reverse phase HPLC by using a linear gradient of 0 to 80 % or 100 % B over 35 min at a flow rate of 5 mL/min (buffer A: 0.1M TEAA, pH7, 5% ACN; buffer B: 0.1M TEAA, pH7, 80 % ACN). ONA were eluted after 15 to 25 min depending on the lipidic part. Product containing fractions were pooled and evaporated to dryness and dissolved in autoclaved milli-Q water.

### 2. Cartridge QSP clarity

#### 3.

Oligonucleotides with the final 5' DMT (trityl-on) were purified on QSP Clarity cartridges, after bases deprotection and cleavage from the beads. Cartridges were first equilibrating with 1 mL of MeOH and 1 mL of H<sub>2</sub>O at a flow rate of 2 drops/second. The samples were then loaded and allowed to pass slowly through the cartridge (1 drop/2-3 second). 1 mL of aqueous solution of 2 % DCA was added (2 drops/second) for detritylation. After rinse with 1 mL of water and cartridge dry, the oligonucleotides were eluted (1 drop/second) with 1 mL of a solution 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> / 50% ACN. Product

containing fractions were pooled and evaporated to dryness and dissolved in autoclaved milli-Q water.

After purification, the concentration of oligonucleotides solutions were determinate by absorbance measurement using a Nanodrop UV/VIS spectrophotometer at 260 nm.

#### **4. Masse des oligonucléotides amphiphiles**

ONA	g/mol
antimiR-diC15-1	7974,55
antimiR-diC15-2	7878,37
A(3')C12	8262,73
A(3')C14	8287,77
A(3')CF	8536,35
A(3')C18	8343,73
MC12	7605,26
MC14	7633,32
MCF	7883,05
MC18	7689,01
A(5')C12	8005,44
A(5')C14	8033,09
A(5')CF	8283,25
BC12	8851,16
BC14	8907,22
BCF	9406,88
CC12	8865,32
CC14	8921,49
CCF	9420,91
CCF	9416,72
DC12	9471,01
DC14	9573,17

## **B. QD-PLATFORM**

### **I. QD water solubilization (formation of micelles)**

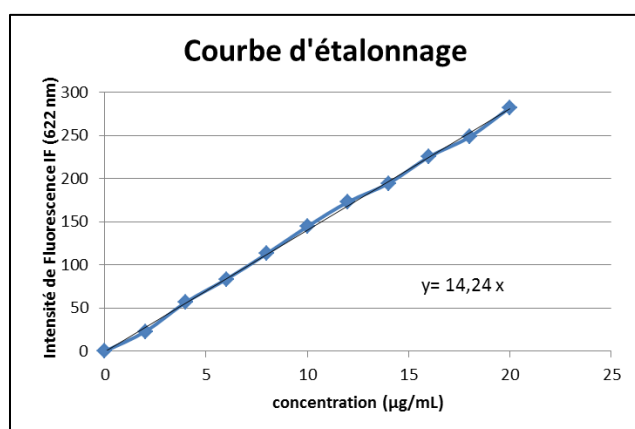
#### **1.1. General procedure**

QD CdSe/Zn S-core-shell (10 mg/mL in toluene) was purchased from Evidentech. 10  $\mu$ L (0.25 nmol) of this solution were added in a flask, mixed with 1 mL of chloroform and dried under vacuum for 2 hours. QDs were then suspended in 5 mL of chloroform with 2.50  $\mu$ mol (20  $\mu$ L of 125 mM solution) of phospholipids or nucleolipids. Different molecules were used: DOPC (1,2-DiOleoyl-*sn*-glycéro-3-Phosphocholine from Bachem), PUPC (PalmiticUridinePhosphoCholine) and PUOH (PalmiticUridine) previously synthesized. The resulting mixture was stirred and distributed in several tubes to improve the surface of the formed film after drying. Chloroform evaporation was performed using a rotavapor at 30°C and 100 rpm under reduced pressure. After complete evaporation of the chloroform, the tubes were heated at 80°C for 1 min. Then a total of 5 mL of autoclaved milli-Q water was added to the tubes and the solution was vigorously stirred in a sonication bath (Fisherbrand FB 11205) to obtain QD solubilisation. At this step, the suspension contains QD-micelles, QD aggregates and excess of phospholipids or nucleolipids. QD-micelles were isolated from QD aggregates by centrifugation at 14000 rpm for 10 min. Additional phospholipids or nucleolipids were removed by ultracentrifugation at 300 000 g for 25 min in a 20% sucrose solution. For this purpose, 100  $\mu$ L of QD solution obtained were dropped on the top of 1 ml of sucrose solution into polycarbonate centrifuge tubes. After ultracentrifugation, a well-defined QD band was observed by using a UV lamp. This band was carefully recovered and the residual sucrose in the QD solution was eliminated by implementing several centrifugation rounds at 19,000g for 10 min by using a Sartorius Vivaspin disposable system (cutoff 10 K) with autoclaved milli-Q water. The QD-micelles were then stored in autoclaved milli-Q water at 4°C in the dark.

## 1.2. QD concentration determination

### - Calibration range:

To determine the final concentration of QD in water, a calibration range was performed based on QD fluorescence properties. Several amount of organic QD in toluene, ranging from 2 to 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were dissolved in 1 mL of chloroform and dried under vacuum for 2 hours. Then QDs were re-suspended in 1 mL of chloroform. 250  $\mu\text{L}$  of each solution were placed in a small-volume quartz cuvette and fluorescence spectra acquired using a LS 55 Perkin Elmer (xenon source excitation, FL WinLab software). Samples were excited at 350 nm (15 nm slit) and emission profiles were recorded from 555 to 655 nm (5 nm slit). The maximum fluorescence value observed at 622 nm were collected and used to make a calibration curve linking fluorescence to the concentration in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The linear part of curve was fitted and given the following equation:



$$F = 14.24 C$$

F is the fluorescence value and C the concentration in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### - Concentration determination

After each QD water solubilization, 250  $\mu\text{L}$  of solution, were freeze by immersion in liquid nitrogen for 5 min and placed in a Lyophilizer (LABCONCO, Freezone), for 5 hours. The dried samples were re-suspended in 250  $\mu\text{L}$  of chloroform and fluorescence spectrum was acquired in the same condition as previously described. The value of the maximum fluorescence at

622 nm was used to determine the concentration, by using the calibration curve.

## **2. QD functionalization**

### **2.1. General procedure**

For the preparation of functionalized QD, ONA containing hydrophobic chains able to interact with the lipidic coating of the QD surface were used. Solubilized QDs in water were prepared at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in an aqueous buffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ , pH7). 1 mL of this suspension (2.5 pmol) was vortexed with 10  $\mu\text{L}$  of a 12.5  $\mu\text{M}$  ONA solution and incubated at 37°C for 1 hour. Excess of free ONA was removed by centrifugation (3000 rpm during 5 min) by using Millipore filters (cutoff 30 kDa).

### **2.2. Number of ONA / QD**

The solution of ONA excess was evaluated by absorbance measurement using a Nanodrop UV/VIS spectrophotometer at 260 nm. The difference between starting material and remaining unbound ONA led to the determination of ONA copy per QD.

## **3. Preparation of ONA-liposome platforms**

For preparation of large multilamellar vesicles (MLV), DOPC was dissolved in chloroform to a final concentration of 125 mM. 100  $\mu\text{L}$  of this solution was mixed with 1 mL of chloroform and evaporated under vacuum forming a thin lipid layer on a flask wall. The lipid film was suspended in 1 mL of aqueous buffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ , pH7) and the solution was vigorously stirred. Subsequently, MLV (2  $\mu\text{m}$  maximum diameter) were formed by subjecting this suspension to 10 freeze/thaw cycles (liquid nitrogen/50°C water bath) and extrusion through a polycarbonate filter (Nucleopore Track Etch membrane, 100 nm diameter) using an extruder (Avanti polar lipids). 100  $\mu\text{L}$  of this liposome stock solution were diluted 10 times with the buffer,

vortexed with ONA (5  $\mu\text{L}$  of a 125  $\mu\text{M}$  aqueous solution, 0.5 mol % total lipids) and incubated at 37°C for 1 hour.

## **II. Physico-chemical characterizations**

### **1. Fluorescence spectroscopy**

Fluorescence spectra of organic, solubilized and functionalized QDs were measured in a small-volume quartz cuvette and acquired using a LS 55 Perkin Elmer (xenon source excitation, FL WinLab software). Samples were excited at 350 nm (15 nm slit) and emission profiles were recorded from 555 to 655 nm (5 nm slit).

### **2. Transmission Electronic Microscopy (TEM) experiments**

TEM studies were performed on a HITACHI H7650 electron microscope in high resolution mode, at the BIC platform (Bordeaux Imaging Center). The software used for images acquisition was "Digital Micrograph (Gatan). 10  $\mu\text{L}$  of QD sample were transferred to on a carbon-Formvar-coated 200-mesh nickel grid and dried for ten minutes before observation.

### **3. Dynamic Light Scattering (DLS)**

Particle size and zeta potential determination were measured on a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instrument, UK). All measurements were conducted at 25 °C with 100  $\mu\text{L}$  of QD suspension diluted into 1mL of autoclaved milli-Q water. The samples were illuminated at 633 nm by He/Ne laser and the detection of the scattered light was made at the angle of 175°. The results of scattering data were analyzed *via* a non-negative least squares algorithm (GP) as implemented in the Zetasizer Nano software.



### III. *in vitro* hybridization, Surface Plasmon Resonance (SPR),

SPR experiments were performed on a Biacore TM 3000 apparatus (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) with L1 sensorchip for direct entrapment of lipid membrane vesicles. L1 sensorchips were prepared by injecting a 1 min pulse of 40 mM N-octyl  $\beta$ -glucopyranoside (Sigma) followed by two 1 min pulses of a 50/50 (vol/vol) mixture of 100 mM HCl and isopropanol, at 100  $\mu$ L/min in water.

Non-tagged QD and LON-QD were diluted to 1  $\mu$ g/mL in the running buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7, 20 °C) and captured (3500-4000 RU) across isolated flow cells at 5  $\mu$ L/min by injecting about 50  $\mu$ L of QD suspensions. About ten 1 min pulses of a freshly prepared 10 mM NaOH solution were injected to eliminate nonspecific immobilization.

Experiments, performed at least in triplicate, were carried out at 25 °C in the running buffer. Different oligonucleotides (fully or partially complementary and scramble sequences) were injected in the running buffer at 20  $\mu$ L/min across the sensor surface (QD and QD-free surfaces) in a single step. The regeneration was achieved with two 1 min pulses of a 10 mM NaOH solution followed by a 1 min pulse of running buffer. Three concentrations of oligonucleotides were injected to determine the kinetic parameters.

All data were double-referenced to remove instrument noises and buffer contribution to the signal. The association and dissociation rate constants,  $k_{on}$  and  $k_{off}$ , respectively, were determined from direct curve fitting of the sensorgrams using BiaEval 4.1 (Biacore), assuming a simple reversible mechanism according to Equations 1 and 2, for the association and the dissociation phases, respectively:

$$(dRU / dt) = k_{on}[Ligand]RU_{max} - (k_{on}[Ligand] + k_{off})RU \quad (1)$$

$$(dRU / dt) = -k_{off}RU_{t0}.e^{-k(t-t_0)} \quad (2)$$

where RU is the signal response; RU<sub>max</sub>, the maximum response level; RU<sub>t0</sub>, the response at the beginning of the dissociation phase; and [Ligand],

the molar concentration of the injected oligonucleotides. The binding equilibrium constant,  $K_d$ , was calculated as  $k_{off}/k_{on}$ .

## **IV. Cell studies**

### **1. Cell culture**

HeLa cells, obtained from Cathy Steadel (ARNA, INSERM U869, Bordeaux) were cultured in monolayer in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS), at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Every 3 days, when cells are confluent, they are detached by a Trypsin-EDTA solution, later eliminated by a centrifugation (5 min at 1000 rpm). The cells were then suspended in a complete growth media and inoculated into a new culture flask for a next cycle. We took care not to grow cells more than 10 cycles after defrosting. The stock cultures were kept in suspended in 90% FCS and 10% DMSO in liquid nitrogen. All reagents for cell cultures were purchased from Invitrogen.

### **2. QD uptake and Fluorescence microscopy**

HeLa cells were seeded in culture Well removable chambered cover glass (8 or 16 wells) at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well in DMEM containing 10% FBS and cultured overnight. After an incubation time of 4 hours with 5 nM of non-tagged QD and QD-ONA, excess QDs were removed by washing cells three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. All samples were incubated with 1 µg/mL Hoechst 33342 (to label DNA (nucleus)) and with 50 µg/mL Concanavalin A Alexafluor 488 (to label cell membrane) for 5 min at room temperature. All the fluorescent markers were purchased from Molecular Probes. Then cells were washed twice with PBS and mounted in Slow Fade Gold mounting media (Invitrogen). The slides were observed by epifluorescence using a Zeiss Axiovert 200 microscope fluorescence (40 X

immersion objective). Images of cell cultures incubated with QDs were also collected by scanning fluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert, AxioCamMRm) inverted microscope equipped with a 40× oil immersion lens. Images were collected using the different excitation (ex) lines and emission (em) filters: QDs, 350 nm (ex), 620 nm (em); Concanavalin A Alexafluor 488, 495 nm (ex), 519 nm (em); Hoechst 33342, 350 nm (ex), 461 nm (em). Phase contrast images were collected using a 633 nm laser illumination. Composite merged images were produced using the LSM Image Browser (Zeiss).

### **3. *in cellulo* hybridization, RT-qPCR**

#### **3.1. Cell transfection**

Twenty-four hours before transfection, HeLa cells were seeded at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well in a 24-well plate in DMEM containing 10% FBS.

##### **- with lipofectamine**

HeLa cells were transfected with 100 nM anti-miR-oligonucleotides or anti-miR-ONA (anti-miR21-diC15-1 and anti-miR21-diC15-2) using the lipofectamine as transfecting agent according to the manufacturer's instructions.

For one well, anti-miR-oligonucleotides (5  $\mu$ L of a 10  $\mu$ M solution, 50 pmol) was diluted in 45  $\mu$ L Opti-MEM (Cat. no. 31985-062), a reduced serum medium and then added to 50  $\mu$ L of diluted lipofectamine (1  $\mu$ L with 49  $\mu$ L to Opti-MEM). This mixture is vigorously mixed and incubated for 20 min to allow complexes formation. The anti-miR-Oligonucleotide-lipofectamine complexes (100  $\mu$ L) were added to the cell culture medium (400  $\mu$ L of complete growth medium), resulting in a final concentration of 100 nM of anti-miR-oligonucleotides in a final volume of 500  $\mu$ L.

##### **- without lipofectamine**

In this case, cells were incubated with ONA (anti-miR21-diC15-1 and anti-miR21-diC15-2) at a final concentration of 1  $\mu$ M (50  $\mu$ L of a 10  $\mu$ M solution) and non-tagged QDs or QD-ONA at 5 nM (100  $\mu$ L of a 25 nM QD

solution, corresponding to 100 nM in ONA). For this, ONA and non-tagged/tagged QDs were diluted in Opti-MEM and directly deliver to cells.

### **3.2. RNA extraction**

After a 72 h of incubation time, total RNA was extracted.

Cells were rinsed with cold PBS and then incubated with 500  $\mu$ L of TRIzol reagent (Invitrogen) for 10 min, at room temperature. The cells were directly lysed in the culture dish by pipetting up and down several times. After transferring into 1.5 mL Eppendorf tube, 50  $\mu$ L of chloroform / isoamyl alcohol (25: 1) were added. The tubes were then vigorously shaken by hand for 15 seconds and centrifuged at 14000 rpm and 4°C for 10 min, to separate the aqueous phase containing the RNA, the phenolic phase containing the proteins and interphase containing DNA. For each tube, the upper aqueous phase, is recovered (approximately 125  $\mu$ L), supplemented with 5  $\mu$ L of Glycoblue glycogen (Ambion) and precipitated with 125  $\mu$ L of isopropanol at -20 ° C overnight. RNA precipitates were recovered by centrifugation for 30 min at 14000 rpm and 4 ° C. The pellet was washed twice with cold ethanol 75 % and suspended in 30  $\mu$ L of ultra-pure RNase free water after air drying. Total RNA extracts are dosed by measuring the absorbance, with a NanoDrop spectrophotometer, at 260 nm (OD 1 = 40 ng/L RNA) and the purity verified by the report OD 260 nm / OD 280 nm which should be of the order of 1.8.

### **3.1. Rt-qPCR**

The expression of mature miR-21 was determined by RT-qPCR using miRNA specific looped RT-primers and TaqMan probes (Applied Biosystems). In parallel U6snRNA expression was also checked and used as an internal control. All samples were transfected 3 times and for each transfection, RT-qPCR experiments were performed in triplicate.

- RT

The RNA extracts were diluted in ultra-pure RNase free water to obtain a final concentration of 10 ng/ $\mu$ L. 1  $\mu$ L of this solution (10 ng of RNA) was mixed with 5  $\mu$ L of a freshly prepared mix containing 0.075  $\mu$ L of dNTP 10 mM, 0.5  $\mu$ L of MultiScribe reverse transcriptase 50 U/ $\mu$ L, 0.75  $\mu$ L of reverse transcription buffer 10 X, 0.095  $\mu$ L of RNase inhibitor 20 U/ $\mu$ L, 3.58  $\mu$ L of water and then 1.5  $\mu$ L of 5X RT primers. Reverse transcription was performed in Thermocycler Biometra T-gradient with the following program: 30 min at 16 ° C, then 30 min at 42 ° C and is inactivated at 85 ° C for 5 min. The cDNA thus obtained are ready to be used Taqman qPCR.

- qPCR

The cDNA thus obtained are used for real time qPCR performed in the Qiagen Rotor-Gene Q apparatus using this program : 10 min at 95 ° C to activate the Taq polymerase, then 40 cycles with the following steps: 15 s at 95° and 60 sec at 60 ° C.

For one tube reaction mixture, we used 1.33  $\mu$ L of cDNA (approximately 2 ng of cDNA), 10  $\mu$ L of 2X PCR master mix containing buffer, dNTPs and Taq polymerase, 1 $\mu$ L of PCR primers probe Labeled specific Taqman Fam40 20X and 7.67 $\mu$ L of water.

- Analysis

Duplex real-time qPCR was performed, and the yellow and green fluorescence emitted by the two probes were measured simultaneously. The change in the amount of microRNA is determined by the method of  $\Delta\Delta$ Ct, by setting the threshold at 0.03. This method does not determine the number of copies, but see a change from a control condition (snARN\_U6).

## **C. HSA-PLATFORM**

### **I. miRNA mimics**

#### **1. Commercially available mimics**

The miR-96 control and the negative miRNA control (scramble) were purchased from Thermo Scientific Dharmacon or Qiagen.

#### **2. Homemade mimics**

Oligonucleotides and ONA were separately synthesized as previously described. After purification, a last hybridization step was performed to allow the formation of double-stranded amphiphile miRNA mimics.

Equimolar amounts (2 nmol) of the complementary passenger and guide strands were dissolved in ultra-pure RNase free water, and annealed in a final volume of 100  $\mu$ L. The solutions were heated at 95°C for 3 min cooled slowly afterward to room temperature. After hybridization, the duplexes samples were dried in SpeedVac to near dryness. Then the right amount of ultra-pure RNase free water was added depending on the purpose and desired concentration, for example:

- 100  $\mu$ L for non modified oligonucleotide mimics (leading to 20  $\mu$ M)
- 30  $\mu$ L for ONA mimics (leading to 66.67  $\mu$ M)

### **II. Physico-chemical characterisations**

#### **1. Thermal denaturation**

The thermal denaturation of oligonucleotide duplex (with ONA or not) was monitored on a VARIAN Cary spectrophotometer equipped with a 6-position sample holder and Peltier temperature control accessory. The experiments were performed at a duplex final concentration of 1 $\mu$ M in a 10 mM sodium cacodylate buffer, 20 mM NaCl, 140 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7. Before

starting experiments the samples were heated at 90 °C for 3 min and then directly put in ice to avoid hybridization. Samples are centrifuged, placed in quartz cuvette, and then covered by 10 drops of paraffin to avoid evaporation. An initial 10 min equilibrium time at 5 °C was included prior to temperature ramping. The denaturation of the samples was achieved by increasing the temperature at 1°C/min from 5°C to 90 °C and was followed at 260 and 350 nm. Experiments were performed at least in triplicate for each sample and the melting temperature ( $T_m$ ) was determined as the maximum of the first derivative of the UV melting curves generated.

## **2. Native electrophoresis**

The double-stranded miRNA mimic formation was confirmed polyacrylamide gel electrophoresis. A solution of 20% acrylamide:bisacrylamide, 4% APS , 0.4% TEMED in TBE 5x was prepared and loaded between the glass plates. After a 30 minutes polymerization step at room temperature, the gel was running (30 mA was applied for 2H). The samples were loaded at a final concentration of 1 $\mu$ M in a loading buffer containing bromophenol blue and xylen cyanol. Then the gel was stained in stains all reagent (from Sigma Ajdrich).

## **3. Dynamic Light Scattering (DLS)**

Nano-object size was measured on a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instrument, UK). All measurements were conducted at 25 °C with 100  $\mu$ L of ONA suspension diluted of ultra-pure RNase free water at a final concentration of 1 $\mu$ M. The samples were illuminated at 633 nm by He/Ne laser and the detection of the scattered light was made at the angle of 175°. The results of scattering data were analyzed *via* a non-negative least squares algorithm (GP) as implemented in the Zetasizer Nano software.

#### **4. Transmission Electronic Microscopy (TEM) experiments**

TEM studies were performed on a HITACHI H7650 electron microscope in high resolution mode, at the BIC platform (Bordeaux Imaging Center). The software used for images acquisition was "Digital Micrograph (Gatan). 10  $\mu$ L of ONA (1  $\mu$ M) sample were transferred to on a carbon-Formvar-coated 200-mesh nickel grid and dried for ten minutes. The samples were stained with 3  $\mu$ L of 2% uranyl acetate before observation.

### **III. Cell studies**

#### **1. Cell culture**

The hepatocellular carcinoma (HCC)-derived HuH7 cell line and a sorted HuH7 cell line, called TGG, which expresses the Tomato and eGFP-GPC3-3'UTR transgenes were used as a model to evaluate our synthetic miRNA mimics. Cell lines obtained from Christophe Grosset (GREF, INSERM 1053, Bordeaux), were maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100  $\mu$ g/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Every 3 days, when cells are confluent, they are detached by a Trypsin-EDTA solution, later eliminated by a centrifugation (5 min at 1000 rpm). The cells were suspended in a complete growth media and inoculated into a new culture flask for a next cycle. We took care not to grow cells more than 10 cycles after defrosting. The stock cultures are kept in suspended in 90 % FCS and 10 % DMSO in liquid nitrogen. All reagents cell cultures were purchased from Invitrogen.

#### **2. Fluorescence microscopy (ONA uptake)**

Huh7 cells were seeded in culture Well removable chambered coverglass (8 wells) for cell culture, at  $5 \times 10^4$  cells per well in DMEM containing 10 % FBS and cultured overnight. After an incubation time of 4 hours with 1  $\mu$ M fluorescein labeled ONA, excess compound were removed by washing three



times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Cells were then fixed in 4 % paraformaldehyde for 10 min at room temperature. All samples were incubated with 1 µg/mL Hoechst 33342 (to label DNA (nucleus)). The cells were then washed twice with PBS and mounted in Slow Fade Gold mounting media. All the fluorescent markers were purchased from Molecular Probes. The slides were observed by epifluorescence using a ZeissAxiovert 200 microscope fluorescence (40X immersion objective).

### **3. Confocal microscopy (ONA trafficking)**

#### **3.1. Cell transfection**

One day prior to transfection, Huh7 cells were seeded at  $5 \cdot 10^4$  cells per well in 1 mL of culture medium in a 24-well plate. The plasmids used (from Patrick Midoux, CMB, UPR 4301, Orléans) were pRab5-EGFP, pRab7-EGFP and pCav1-GFP where the C-terminus of Rab5, Rab7 and Cav are fused with EGFP. The cells were incubated with the transfection mixtures (30 µg PEI-histidine EB131b and 10 µg plasmidic DNA in HEPES 10mM) for 4 hours at 37 °C. Then, the medium was removed and replaced by a fresh complete medium and cells were grown during 2 days. The cells are detached by a Trypsin-EDTA solution, later eliminated by a centrifugation (5 min at 1000 rpm) and then resuspended in a complete growth media and inoculated into a new culture flask for the next experiment.

#### **3.2. TAMRA labeled ONA incubation and confocal microscopy**

Huh7 cells stably expressing Rab5-EGFP, Rab7-EGFP or Cav1-GFP were seeded at a density of  $5 \cdot 10^4$  cells per well in a 4-well Lab-Tek chambered coverglass and cultured overnight in DMEM containing 10 % FBS. The Cells were incubated with different concentrations of TAMRA labeled ONA ranging from 0.2 to 2 µM in serum free medium. After 3 hours and 6 hours of incubation, excess of ONA were removed by washing three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Cells were then fixed in 4 % paraformaldehyde for 10 min at room temperature, washed twice with PBS

and mounted in Slow fade Gold mounting media. The observation was performed with a confocal laser scanning microscopy (CLSM, Zeiss Axiovert 200M microscope) coupled with a Zeiss LSM 510 scanning device. The inverted microscope was equipped with a Plan-Apochromat 63× objective (NA = 1.4) and with a temperature controlled stage.

#### **4. DF-FUNREG analyses (anti-miR-96 mimics functional activity)**

##### **4.1. miRNA mimics transfection**

###### ➤ with lipofectamine

All miR-96 mimics (amphiphile or not) were transferred into the target TGG cells by reverse transfection using Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) according to manufacturer's instructions, at a final concentration of 20 nM in 96-well plates.

For this, miR-96 mimics stock solutions at 20 μM were diluted at 1.33 μM in ultra-pure RNase free water.

In each well, 1.5 μL of the freshly prepared solution (2 pmol of mimic), was mixed with 0.25 μL of Lipofectamine RNAi Max previously diluted in Opti-MEM, for a total volume of 18.5 μL. After 20 min of incubation, 80 μL of a cell suspension at 125000 cells/mL (10000 cells per well) were added to the complexes. Cells were prepared in a complete growth medium without antibiotics and contained the appropriate number of cells to give 30-50 % confluence 24 hours after plating.

###### ➤ without lipofectamine

Amphiphile miR-96 mimics were transferred into the target TGG cells at a final concentration of 1 μM without using any transfecting agent. For this, ONA stock solutions were prepared at 66.67 μM in ultra-pure ultra-pure RNase free water. In each well, 1.5 μL of this solution (100 pmol of ONA), was directly mixed with 18.5 μL of Opti-MEM and incubated with the cells.

The transfected cells were incubated during 72 H, at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

## **4.2. Flow cytometry**

DF-FunREG analyses were performed three days after transfection by measuring the TOMATO and eGFP expression.

TGG cells were washed in PBS and detached with trypsin/EDTA, collected and analyzed by FACS using a BD LSR Fortessa cell analyzer and the BD FACS Diva software (BD Biosciences). One thousand cellular events were gated using forward and side scatter settings. A fluorescence compensation of 0,3% was applied to TOMATO.

## **IV. HSA-LON interaction, Surface Plasmon Resonance (SPR)**

Surface plasmon resonance analyses were performed using a Biacore TM 3000 apparatus (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) equipped with a CM5 sensor chips. HSA, as well as streptavidin (SA) and human carbonic anhydrase (HCA3) were immobilized using amine-coupling chemistry in running buffer of 53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM NaCl, pH 7.4. Each flow cell was activated for 7 min with a 1:1 mixture of 0.1 M N-hydroxysuccinimide and 0.1 M 3-(N,N-dimethylamino)propyl-N-ethylcarbodiimide at a flow rate of 20 µL/min at 25°C.

30 µL of protein solution at a concentration of 37.5 µg/mL in 10 mM sodium acetate, pH 5.2, were injected at a flow rate of 5 µL/min resulting in immobilized densities from 7000 to 9000 RU. The surfaces were then blocked with a 7-min injection of 1 M ethanolamine, pH 8.0, followed by three 10-s injections of 50 mM NaOH to remove non covalently bound protein.

ONA, in simple or double strand, were injected over the protein and reference surfaces from 0.2 to 500 µM at a flow rate of 20 µL/min following with a 10 s injection of 50 mM NaOH and running buffer. Triplicate injections of each concentration were carried out in random order. After a double referencing procedure with buffer and non-functionalized surface correction we were able to determine the equilibrium dissociation constants

for the ONA/protein interaction. The equilibrium response data were fit to an independent-binding-sites model:

$$R = (R_{\max} * (C/K_d) ) / ( 1+(C/K_d))$$

Where  $R_{\max}$  is the maximal response,  $C$  is the ONA concentration, and  $K_d$  is the equilibrium dissociation constant. Fitting was done using the Kaleidagraph software.



# Références bibliographiques

---

1. R. Lee, R. Feinbaum, and V. Ambros, *Cell*, 1993. 75, 843.
2. B. Wightman, I. Ha and G. Ruvkun, *Cell*, 1993,75, 855.
3. B. J. Reinhart, F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz and G. Ruvkun, *Nature*, 2000, 403, 901.
4. M.W. Rhoades, B.J. Reinhart, L.P. Lim, C.B. Burge, B. Bartel and D.P. Bartel, *Cell*, 2002, 110, 513.
5. A.J. Enright, B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander and D.S. Marks., *Genome.Biol.*, 2003, 5.
6. A. Krek, D. Grün, M.N. Poy, R. Wolf, L.Rosenberg , E.J. Epstein, P.MacMenamin, I. da Piedade, K.C. Gunsalus, M. Stoffel and N. Rajewsky, *Nat. Genet.*, 2005, 5, 495.
7. M. Kiriakidou, P.T. Nelson, A. Kouranov, P. Fitziev, C. Bouyioukos, Z. Mourelatos and A. Hatzigeorgiou. *Genes Dev.*, 2004, 18, 1165.
8. B.P. Lewis, C.B. Burge and D.P. Bartel, *Cell.*, 2005, 120, 15.
9. N.C. Lau, P.L. Lim, E.G. Weinstein and D.P. Bartel, *Science*, 2001, 294,858.
10. M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl, *Science*, 2001, 294, 853.
11. X. Cai, C.H. Hagedorn and B.R. Cullen, *RNA-Publ. RNA Soc.*, 2004, 10, 1957.
12. Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek and V.N. Kim, *EMBO J.*, 2004, 23, 4051.
13. G.M. Borchert, W. Lanier and B.L. Davidson, *Nat. Struct. Mol. Cell Biol.*, 2006, 13, 1097.
14. Y. Lee, K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim and V.N. Kim, *EMBO J.*, 2002, 21, 4663.
15. Y. Zeng and B.R. Cullen, *RNA-Publ. RNA Soc.*, 2003, 9, 112.
16. J. Han, Y. Lee, K.H. Yeom, Y.K. Kim, H. Jin and V.N. Kim, *Genes Dev.*,2004, 18, 3016.
17. M. Landthaler, A. Yalcin and T. Tuschl, *Curr. Biol.*, 2004, 14, 2162.
18. R.I. Gregory, K.P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch and R. Shiekhattar, *Nature* , 2004, 432, 235.
19. J. Han, Y. Lee, K.H. Yeom, J.W. Nam, I. Heo, J.K. Rhee, S.Y. Sohn, Y. Cho, B.T. Zhang and V.N. Kim, *Cell*, 2006, 125, 887.
20. Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V.N. Kim, *Nature*, 2003, 425, 415.
21. E. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg and U. Kutay, *Science*, 2004, 95.
22. R. Yi, Y. Qin, L.G. Macara and B.R. Cullen, *Genes Dev.*, 2003, 17, 3011.
23. C. Gwizdek, B.O. Nazari, A.M. Brownawell, A. Doglio, E. Bertrand, L.G. Macara and C. Dargemont, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 5505.
24. Y. Zeng and B.R. Cullen, *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 4776.

25. A. Grishok, A.E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D.L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun and C.C. Mello, *Cell*, 2001, 106, 23.
26. G. Hutvagner, J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl and P.D. Zamore, *Science*, 2001, 293, 834.
27. T.P. Chendrimada, R.I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar, *Nature*, 2005, 436, 740.
28. A.D. Haase, L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gatignol and W. Filipowicz, *EMBO Rep.*, 2005, 6, 961.
29. M.A. Carmell, Z. Xuan, M.Q. Zhang and G.J. Hannon, *Genes Dev.*, 2002, 16, 2733.
30. K. Forstemann, Y. Tomari, T. Du, V.V. Vagin, A.M. Denli, D.P. Bratu, C. Klattenhoff, W.E. Theurkauf and P.D. Zamore, *PLoS Biol.*, 2005, 3, 236.
31. S. Diederichs and D.A. Haber, *Cell*, 2007, 131, 1097.
32. A. Khvorova, A. Reynolds and S.D. Jayasena, *Cell*, 2003, 115, 209.
33. Maniataki and Z. Mourelatos, *Genes Dev.*, 2005, 19, 2979.
34. I.J. MacRae, E. Ma, M. Zhou, C.V. Robinson and J.A. Doudna, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 512.
35. R.I. Gregory, T.P. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar, *Cell*, 2005, 123, 631.
36. V. Ambros, *Nature*, 2004. 431(7006), 350.
37. D.P. Bartel, *Cell*, 2004. 116(2), 281.
38. J.R. Lytle, T.A. Yario, and J.A. Steitz, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(23), 9667.
39. W. Filipowicz, S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Nat Rev Genet*, 2008. 9(2), 102.
40. A. Grimson, K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim and D.P. Bartel, *Mol Cell.*, 2007, 27, 91.
41. R. Nielsen, I. Hellmann, M. Hubisz, C. Bustamante, A.G. Clark, *Nat Rev Genet.*, 2007, 11, 857.
42. S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl, *Nature*, 2001, 411, 494.
43. S. Rüdel, A. Flatley, L. Weinmann, E. Kremmer and G. Meister, *RNA*, 2008, 14, 1244.
44. C. Esau, X. Kang, E. Peralta, E. Hanson, E.G. Marcusson, L.V. Ravichandran, Y. Sun, S. Koo, R.J. Perera, R. Jain, N.M. Dean, S.M. Freier, C.F. Bennett, B. Lollo and R. Griffey, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 52361.
45. Q. Jing, S. Huang, S. Guth, T. Zarubin, A. Motoyama, J. Chen, D.F. Padova, S.C. Lin, H. Gram and J. Han, *Cell*, 2005, 120, 623.
46. E. Vigorito, K.L. Perks, C. Abreu-Goodger, S. Bunting, Z. Xiang, S. Kohlhaas, P.P. Das, E.A. Miska, A. Rodriguez, A. Bradley, K.G. Smith, C. Rada, A.J. Enright, K.M. Toellner, I.C. MacLennan and M. Turner, *Immunity*, 2007, 27, 847.
47. A. Rodriguez, E. Vigorito, S. Clare, V.M. Warren, P. Couttet, R.D. Soond, V.S. Dongen, J.S. Grocock, P.P. Das, A.E. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, J.A. Enright, G. Dougan, M. Turner and A. Bradley, *Science*, 2007, 316, 608.

48. C.H. Lecellier, P. Dunoyer, K. Arar, J. Lehmann-Che, S. Eyquem, C. Himber, A. Saib and O. Voinnet, *Science*, 2005, 308, 557.
49. G.A.Calin, C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo and E.Noeh, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99, 15524.
50. G.A.Calin, M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu and S.E. Wojcik, *N Engl J Med*, 2005, 353, 1793.
51. G.A. Calin, C. Sevignani, C.D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noeh and S. Yendamuri, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, 2999.
52. E.S. Raveche, E. Salerno, B.J. Scaglione, V. Manohar, F. Abbasi and Y.C. Lin, *Blood*, 2007, 109, 5079.
53. T.C. Chang, E.A. Wentzel, O.A.Kent, K. Ramachandran, M. Mullendore, K.H.Lee, G. Feldmann, M. Yamakuchi, M. Ferlito and C.J. Lowenstein, *Mol Cell*, 2007, 26, 745.
54. L. He, X. He, L.P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus and D. Ridzon, *Nature*, 2007, 447, 1130.
55. W.M. Merritt, Y.G. Lin, L.Y. Han, A.A. Kamat, W.A. Spannuth, R. Schmandt, D. Urbauer, L.A. Pennacchio, J.F. Cheng and A.M. Nick, *N Engl J Med*, 2008, 359, 2641.
56. J.M. Thomson, M. Newman, J.S. Parker, E.M. Morin-Kensicki, T. Wright and S.M. Hammond, *Genes Dev*, 2006, 20, 2202.
57. Y. Wang, R. Medvid, C. Melton, R. Jaenisch and R. Blelloch, *Nat Genet*, 2007, 39, 380.
58. B. Weber, C. Stresemann, B. Brueckner and F. Lyko, *Cell Cycle*, 2007, 6, 1001.
59. U. Lehmann, B. Hasemeier, M. Christgen, M. Muller, D. Romermann, F. Langer and H. Kreipe, *J Pathol*, 2008, 214, 17.
60. M. Toyota, H. Suzuki, Y. Sasaki, R. Maruyama, K. Imai, Y. Shinomura and T. Tokino, *Cancer Res*, 2008, 68, 4123.
61. B. Brueckner, C. Stresemann, R. Kuner, C. Mund, T. Musch, M. Meister, H. Sultmann and F. Lyko, *Cancer Res*, 2007, 67, 1419.
62. M.V. Iorio, R. Visone, G. Di Leva, V. Donati, F. Petrocca, P. Casalini, C. Taccioli, S. Volinia, C.G. Liu, H. Alder and al, *Cancer Res*, 2007, 67, 8699.
63. D. Hanahan and R.A. Weinberg, *Cell*, 2000, 100, 57.
64. W.C. Cho, *Mol Cancer*, 2007, 25, 6.
65. B. Zhang, X. Pan, G.P. Cobb and T.A. Anderson, *Dev Biol.*, 2007, 302, 1.
66. K. Ruan, X.Fang and G. Ouyang, *Cancer Lett.*, 2009, 285, 116.
67. L.B. Frankel, N.R. Christoffersen, A. Jacobsen, M. Lindow, A. Krogh and A.H. Lund, *J Biol Chem*, 2008, 283, 1026.
68. F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S.T. Jacob and T. Patel, *Gastroenterology*, 2007, 133, 647.
69. R. Garzon, S. Volinia, C.G. Liu, C. Fernandez-Cymering, T. Palumbo, F. Pichiorri, M. Fabbri, K. Coombes, H. Alder, T. Nakamura and al, *Blood*, 2008, 111, 3183.
70. L. He, J.M. Thomson, M.T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, G.J. Hannon and al, *Nature*, 2005, 435, 828.



71. P. Mu, Y.C. Han, D. Betel, E. Yao, M. Squatrito, P. Ogradowski, E. de Stanchina, A. D'Andrea, C. Sander and A. Ventura, *Genes Dev*, 2009, 23, 2806.
72. M. Dews, A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E.E. Furth, W.M. Lee, G.H. Enders, J.T. Mendell and al, *Nat Genet*, 2006, 38, 1060.
73. L. Ma, J. Teruya-Feldstein and R.A. Weinberg, *Nature*, 2007, 449, 682.
74. N. Li, H. Fu, Y. Tie, Z. Hu, W. Kong, Y. Wu and X. Zheng, *Cancer Lett*, 2009, 275, 44.
75. L. Polisenio, A. Tuccoli, L. Mariani, M. Evangelista, L. Citti, K. Woods, A. Mercatanti, S. Hammond and G. Rainaldi, *Blood*, 2006, 108, 3068.
76. J. Lu, G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb and D. Peck, *Nature*, 2005, 435, 834.
77. G. Nakajima, K. Hayashi, Y. Xi, K. Kudo, K. Uchida and K. Takasaki, *Cancer Genomics Proteomics*, 2006, 3, 317.
78. Z. Huang, D. Huang, S. Ni, Z. Peng, W. Sheng and X. Du, *Int J Cancer*, 2010, 127, 118.
79. E.K. Ng, W.W. Chong, H. Jin, E.K. Lam, V.Y. Shin and J. Yu, *Gut*, 2009, 58, 1375.
80. F. Graziano, E. Canestrari, F. Loupakis, A. Ruzzo, N. Galluccio and D. Santini, *Pharmacogenomics J* 2010, 10, 458.
81. S.L. Yu, H.Y. Chen, G.C. Chang, C.Y. Chen, H.W. Chen and S. Singh, *Cancer Cell*, 2008, 13, 48.
82. S.F. Tavazoie, C. Alarcón, T. Oskarsson, D. Padua, Q. Wang, P.D. Bos, W.L. Gerald and J. Massagué, *Nature*, 2008, 451, 147.
83. M. Negrini and G.A. Calin, *Breast Cancer Res.*, 2008, 10, 203.
84. T. Schepeler, J.T. Reinert, M.S. Ostefeld, L.L. Christensen, A.N. Silahatoglu and L. Dyrskjot, *Cancer Res*, 2008, 68, 6416.
85. A. Bhardwaj, S. Singh and A.P. Singh, *Mol Cell Pharmacol.*, 2010, 2, 213.
86. M.L. Si, S. Zhu and H. Wu, *Oncogene*, 2007, 26, 2799.
87. K. Gumireddy, D.D Young and X. Xiong, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47, 7482.
88. M.S. Ebert, J. R. Neilson and P.A. Sharp, *Nat Methods* 2007, 4, 721.
89. W.Y. Choi, A.J. Giraldez and A.F. Schier, *Science*, 2007, 318, 271.
90. J. Xiao, B. Yang and H. Lin, *J Cell Physiol*, 2007, 212, 285.
91. J. Stenvang, A. Petri, M. Lindow, S. Obad and S. Kauppinen, *Silence*, 2012, 3, 1.
92. S. Obad, C.O. dos Santos, A. Petri, M. Heidenblad, O. Broom, C. Ruse, C. Fu, M. Lindow, J. Stenvang, E.M. Straarup, H.F. Hansen, T. Koch, D. Pappin, G.J. Hannon and S. Kauppinen, *Nat Genet* 2011, 43, 371.
93. A. Bhardwaj, S. Singh and A.P. Singh, *Mol Cell Pharmacol.*, 2010, 2, 213.
94. J. Takamizawa, H. Konishi and K. Yanagisawa, *Cancer Res*, 2004, 64, 3753.
95. J. Kota, R.R. Chivukula and K.A. O'Donnell, *Cell* 2009, 137, 1005.
96. N. Tsuda, S. Ishiyama, Y. Li and al, *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 6557.
97. B. Janet and H. Amir, *Pharmaprojects*, 2008, 29.

98. J. Elmen, M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtnarn, H. Frydenlund, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E.M. Straarup and S. Kauppinen, *Nature*, 2008, 452, 896.
99. F. Wahid, A. Shehzad, T. Khan and Y.Y. Kim, *Biochim Biophys Acta.*, 2010, 1803, 1231.
100. S.D. Selcuklu, M.T. Donoghue and C. Spillane, *Biochem Soc Trans*, 2009, 37, 918.
101. S. Elmore, *Toxicol Pathol.*, 2007, 35, 495.
102. L.E. Buscaglia and Y. Li, *Chin J Cancer*, 2011, 30, 371.
103. M.L. Si, S. Zhu, H. Wu, Z. Lu, F. Wu and Y.Y. Mo, *Oncogene*, 2007, 26, 2799.
104. B.G. Garchow, O. Bartulos Encinas, Y.T. Leung, P.Y. Tsao, R.A. Eisenberg, R. Caricchio, S. Obad, A. Petri, S. Kauppinen and M. Kiriakidou, *EMBO Mol Med.*, 2011, 3, 605.
105. M.F. Corsten, R. Miranda, R. Kasmieh, A.M. Krichevsky, R. Weissleder and K. Shah, *Cancer Res*, 2007, 67, 8994.
106. J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009, 48, 1378.
107. M. Elsabahy, A. Nazarali and M. Foldvari, *Curr Drug Deliv.*, 2011, 8, 235.
108. R.L. Juliano, X. Ming and O. Nakagawa, *Acc Chem Res.*, 2012, 45, 1067.
109. Y. Singh, P. Murat and E. Defrancq *Chem Soc Rev.*, 2010, 39, 2054.
110. T. Tennilä, M. Antopolsky, A. Azhayevev and E. Azhayeveva, *Bioconjug Chem.*, 2008, 19, 1361.
111. B.A. Williams and J.C. Chaput, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.*, 2010, 4, 41.
112. B. de Lambert, C. Chaix, M.T. Charreyrex, A. Laurent, A. Aigoui, A. Perrin-Rubens and C. Pichot, *Bioconjug Chem.*, 2005, 16, 265.
113. A. Gissot, C. Di Primo, I. Bestel, G. Giannone, H. Chapuis and P. Barthélémy, *Chem. Commun.*, 2008, 5550.
114. D. A. Stetsenko and M. J. Gait, *Bioconjugate Chem.*, 2001, 12, 576.
115. H. Chapuis, L. Bui, I. Bestel and P. Barthélemy, *Tetrahedron Lett.*, 2008, 49, 6838
116. H. Lonnberg, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 1065–1094.
117. D. A. Stetsenko and M. J. Gait, *J. Org. Chem.*, 2000, 65, 4900.
118. H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 2004.
119. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 2596.
120. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless and V.V. Fokin, *J Am Chem Soc.*, 2005, 127, 210.
121. T.S. Seo, Z. Li, H. Ruparel and J. Ju, *J Org Chem.*, 2003, 68, 609.
122. R. Lucas, R. Zerrouki, R. Granet, P. Krausz and Y. Champavier, 2008, 64, 5467.
123. R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpene, P. Lincoln, L.M. Wilhelmsson and T. Brown, *J Am Chem Soc.*, 2007, 129, 6859.

124. S.E. Averick, E. Paredes, D. Grahacharya, B.F. Woodman, S.J. Miyake-Stoner, R.A. Mehl, K. Matyjaszewski and S.R. Das, *Langmuir*, 2012, 28, 1954.
125. J.M. Baskin, J.A. Prescher, S.T. Laughlin, N.J. Agard, P.V. Chang, I.A. Miller, A. Lo, J.A. Codelli and C.R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104, 16793.
126. J.C. Jewett, E.M. Sletten, and C.R. Bertozzi, *J Am Chem Soc.*, 2010, 132, 3688.
127. X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert and G.-J. Boons, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008, 47, 2253.
128. M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, and A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun*, 2011, 47, 6257.
129. I.S. Marks, J.S. Kang, B.T. Jones, K.J. Landmark, A.J. Cleland and T.A. Taton, *Bioconjug Chem.*, 2011, 22, 1259.
130. A.Patwa, A. Gissot, I. Bestel and P. Barthélémy, *Chem Soc Rev.*, 2011, 40, 5844.
131. M. Banchelli, F. Betti, D. Berti, G. Caminati, F. B. Bombelli, T. Brown, L. M. Wilhelmsson, B. Norde'n and P. Baglioni, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 10942.
132. B. M. Laing, L. Barrow-Laing, M. Harrington, E. C. Long and D. E. Bergstrom, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21, 1537.
133. A. Gissot, M. Camplo, M.W. Grinstaff and P. Barthélémy, *Org Biomol Chem*, 2008, 6, 1324.
134. R. L. Letsinger, S. K. Chaturvedi, F. Farooqui and M. Salunkhe, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 7535.
135. L. Ma, F. Reinhardt, E. Pan, J. Soutschek, B. Bhat, E. G. Marcusson, J. Teruya-Feldstein, G. W. Bell and R. A. Weinberg, *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28, 341
136. K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa and T. Yokota, *Mol. Ther.*, 2008, 16, 734.
137. G. Zhang, F. Farooqui, O. Kinstler and R. L. Letsinger, *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37, 6243.
138. U. Jakobsen, A. C. Simonsen and S. Vogel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 10462.
139. F. Baldelli Bombelli, F. Betti, F. Gambinossi, G. Caminati, T. Brown, P. Baglioni and D. Berti, *Soft Matter*, 2009, 5, 1639.
140. S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, 1859.
141. A. Gissot, C. Di Primo, I. Bestel, G. Giannone, H. Chapuis and P. Barthélémy, *Chem Commun (Camb)*., 2008, 43, 5550.
142. G. Godeau, C. Staedel and P. Barthélémy, *J Med Chem.*, 2008, 51, 4374.
143. J. Hiebl and al, *J. Med. Chem.*, 1991, 34,1426.
144. P.M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich and T.Carell, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2008, 47, 3442.
145. T. Yamada, C.G. Peng, S. Matsuda, H. Addepalli, K.N. Jayaprakash, M.R. Alam, K. Mills, M.A. Maier, K. Charisse, M. Sekine, M. Manoharan and K.G. Rajeev, *J Org Chem.*, 2011, 76, 1198.
146. K.A. Cissell and S.K. Deo, *Anal Bioanal Chem.*, 2009, 394, 1109.

147. H. Seo, S. Kim, J.I. Kim, H. Kang, W. Jung and W.S. Yeo, *Anal Biochem.*, 2012, 3,00581.
148. H. Arata, H. Komatsu, A. Han, K. Hosokawa and M. Maeda, *Analyst*, 2012, 137, 3234.
149. Z. Cai, Y. Song, Y. Wu, Z. Zhu, C. James Yang and X.Chen, *Biosens Bioelectron*, 2012.
150. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke and T. Nann, *Nat. Methods*, 2008, 5, 763.
151. A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 13226.
152. X. Wu, H. Liu, J. Liu, K.N. Haley, J.A. Treadway, J.P. Larson, N. Ge, F. Peale and M.P. Bruchez, *Nat Biotechnol.*, 2003, 21, 41.
153. C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115, 8706.
154. S. Pathak, S. K. Choi, N. Arnheim and M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 4103.
155. B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou and A. Libchaber, *Science*, 2002, 298, 1759.
156. B. Ballou, B.C. Lagerholm, L.A. Ernst, M.P. Bruchez and A.S. Waggoner, *Bioconjug Chem*, 2004, 15, 79.
157. N. Travert-Branger, F. Dubois, O. Carion, G. Carrot, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris and C. Mioskowski, *Langmuir.*, 2008, 24, 3016.
158. K.T. Yong, W.C. Law, I. Roy, Z. Jing, H. Huang, M.T. Swihart and P.N. Prasad, *J Biophotonics*, 2011, 4, 9.
159. M.K. Yu, J. Park and S. Jon, *Theranostics*, 2012, 2, 3.
160. R.A. Sperling and W.J. Parak, *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.*, 2010, 368, 1333.
161. Y.P. Ho and K.W., *Leong Nanoscale*, 2010, 2, 60.
162. M.J. Clift and V. Stone, *Theranostics*, 2012, 2, 668.
163. Y. Zhang and T.H. Wang, *Theranostics*, 2012, 2, 631.
164. J. Lee, Y. Choi, J. Kim, E. Park and R. Song, *Chemphyschem.*, 2009, 10, 806.
165. N. Taib, A. Aimé, L. Moreau, M. Camplo, S. Houmadi, B. Desbat, M. Laguerre, M.W. Grinstaff, I. Bestel and P. Barthélémy, *J Colloid Interface Sci.*, 2012, 377, 122.
166. N. Taib, A. Aimé, S. Houmadi, S. Castano, P. Barthélémy, M. Laguerre and I. Bestel, *Langmuir.*, 2012, 28, 7452.
167. V. Arroyo, *Hepatology*, 2009, 50,355.
168. S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda and K. Kobayashi, *Protein Eng.*, 1999, 12, 439.
169. S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick and N. Franks, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, 5, 827.
170. Z. Luo, X. Shi, Q. Hu, B. Zhao and M. Huang, *Chem. Res. Toxicol.*, 2012, 25, 990.
171. W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O.D. Wiestler, F. Zanella, H.J. Reulen, *Lancet Oncol*, 2006, 5, 392.
172. B. Elsadek and F. J. Kratz, *Control Release*, 2012, 157, 4.
173. E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao and S. Tomao, *Int J Nanomedicine*, 2009, 4, 99.

174. Lu W, Xiong C, Zhang R, Shi L, Huang M, Zhang G, Song S, Huang Q, Liu GY, Li C. *J Control Release*. 2012 Aug 10;161(3):959-66
175. L. Meng, L. Yang, X. Zhao, (2012)*PloS ONE* 7, e33434.
176. B. Le Bail, S. Faouzi, L. Boussarie, J. Guirouilh, J.F. Blanc, J. Carles, P. Bioulac-Sage, C. Balabaud and J. Rosenbaum, *J. Osteonectin, J. Pathol.* 1999, 189, 46.
177. C.P. Lau, R.T. Poon, S.T. Cheung, W.C. Yu and S.T. Fan, *J. Pathol.*, 2006, 210, 459.
178. S. Jain, S. Singhal, P. Lee, R. Xu, *Am J Transl Res.*, 2010, 2, 105.
179. a) M. Ho and H. Kim, *Eur J Cancer*, 2011, 47, 333. b) M.I. Capurro, Y.Y. Xiang, C. Lobe and J. Filmus, *Cancer Res.*, 2005, 65, 6245.
180. S. Jalvy-Delville, M. Maurel, V. Majo, N. Pierre, S. Chabas, C. Combe, J. Rosenbaum, F. Saggiocco, C.F. Grosset, *Nucleic Acids Res.*, 2012, 40, 1356.
181. S. Jalvy-Delville, M. Maurel, V. Majo, N. Pierre, S. Chabas, C. Combe, J. Rosenbaum, F. Saggiocco and C.F. Grosset, *Nucleic Acids Res.*, 2012, 40, 1356.
182. M. Maurel, S. Jalvy, Y. Ladeiro, C. Combe, L. Vachet, F. Saggiocco, P. Bioulac-Sage, V. Pitard, H. Jacquemin-Sablon, J. Zucman-Rossi, B. Laloo and C.F. Grosset, *Hepatology*, 2012. doi: 10.1002/hep.25994. [Epub ahead of print]
183. B. Laloo, D. Simon, V. Veillat, D. Lauzel, V. Guyonnet Duperat, F. Moreau-Gaudry, F. Saggiocco and C. Grosset, *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8, 1777.
184. B.M. Laing, L. Barrow-Laing, M. Harrington, E.C. Long and D.E. Bergstrom, *Bioconjug Chem.*, 2010, 21, 1537.  
a) M. Banchelli, F. Betti, D. Berti, G. Caminati, F. B. Bombelli, T. Brown, L. M. Wilhelmsson, B. Norde'n and P. Baglioni, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 10942. b) M. Banchelli, F. Gambinossi, A. Durand, G. Caminati, T. Brown, D. Berti and P. Baglioni, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, 7348.
185. S. Mayor and R.E. Pagano, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2007, 8, 603.
186. L. Billiet, J.P. Gomez, M. Berchel, P.A. Jaffrès, T. Le Gall, T. Montier, E. Bertrand, H. Cheradame, P. Guégan, M. Mével, B. Pitard, T. Benvegna, P. Lehn, C. Pichon and P. Midoux, *Biomaterials.*, 2012, 33, 2980.
187. K. Sasaki, N.H. Tsuno, E. Sunami, G. Tsurita, K. Kawai, Y. Okaji, T. Nishikawa, Y. Shuno, K. Hongo, M. Hiyoshi, M. Kaneko, J. Kitayama, K. Takahashi and H. Nagawa, *BMC Cancer*. 2010, 10, 370.



# Résumés

---

De nombreuses études ont montré l'intérêt thérapeutique de molécules dérivant des microARN (inhibiteurs ou analogues) en oncologie. Cependant avant d'espérer en faire de futurs médicaments, il est indispensable d'élaborer des systèmes permettant leur délivrance préférentielle dans les cellules cancéreuses. Dans ce travail, nous avons développé deux plateformes innovantes basées sur les microARN : la première utilise les propriétés optiques des quantum dots (QD) et est destinée à l'imagerie des microARN ; la seconde repose sur la sérum albumine humaine (SAH) et a une finalité de délivrance ciblée de microARN. La mise en place de ces plateformes a nécessité la synthèse d'une petite chimiothèque de bioconjugués lipidiques dérivés des microARN (inhibiteurs ou analogues), le but étant d'exploiter l'effet hydrophobe pour les fixer à la surface des QD (ancrage hydrophobe dans la paroi lipidique des QD) et de la SAH (interaction avec les sites de liaison aux acides gras). Dans les deux cas, différentes études incluant des caractérisations physico-chimiques (MET, DLS), des expériences *in vitro* (SPR) et *in cellulo* (microscopie de fluorescence, criblage fonctionnel, RTqPCR) ont montré la potentialité de ces nouvelles plateformes.

Exploitation of gene-silencing is a very promising strategy in human therapeutics. Several engineered small non coding RNAs (inhibitors or mimics) are already in preclinical and clinical trials. However a key impediment to the wider success of these approaches remains the specific delivery of RNA-derived molecules into cancerous cells. This work aimed at developing two innovative microRNA-based platforms : the first one relying on quantum dots (QD) is dedicated to microRNA imaging and the second one based on human serum albumin (HSA) represents a new targeted delivery system. The implementation of both platforms required the synthesis of a small library of microRNA derived lipidic bioconjugates (inhibitors or mimics), the aim being to exploit the hydrophobic effect for their loading on QD (hydrophobic anchoring in the hydrophobic QD surface) and on HSA (interaction with fatty acid binding sites). In both cases, different studies including physico-chemical characterizations (TEM, DLS), *in vitro* (SPR) and *in cellulo* experiments (fluorescence microscopy, functional screening, RTqPCR) demonstrated the great promises held by these new platforms.





# Publications et communications

---

## Publications

- Taib, N. ; Aimé, A. ; Moreau, L. ; Camplo, M. ; Houmadi, S. ; Desbat, B. ; Laguerre, M. ; Grinstaff, M. ; Bestel, I. ; Barthélémy, P. Formation of supramolecular systems via directed nucleoside-lipide recognition. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 377, 122-130.
- Taib, N.; Aimé A.; HOumadi, S.; Castano, S. ; Barthélémy, P. ; Laguerre, M. ; Bestel I. Interactions of nucleolipids with oligonucleotides : molecular modelling and physicochemical studies. *Langmuir*, 2012, 28, 7452-60.
- Aye, M.; Di Giorgio, C., Berque-Bestel, I. ; Aimé A. ; Pichon, B.P. ; Jammes, Y. ; Barthélémy, P. and De Méo M. Genotoxic and mutagenic effects of lipid-coated CdSe/ZnS quantum dots. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *Mutat Res.* 2012 Nov 10
- Aimé, A.; Beztsinna, N., Patwa, A.; Pokolenko, A., Bestel, I. And Barthélémy, P. Lipid oligonucleotide conjugates functionalized quantum dots: synthesis, characterization and cellular effects. *Bioconjugate Chem*, 2012, submitted.

## Communications orales:

- Aimé A., Beztsinna N., Patwa A., Gissot A., Barthélémy P., Bestel I. microRNA-based nanoplatform. Rencontre du RNA club de bordeaux, Bordeaux, Septembre 2012 (communication en anglais).
- Aimé A., Beztsinna N., Maurel M, Grosset C., Bestel I. Auto-vectorized microRNA mimic-based nanosystem for hepatocellular carcinoma therapy. Rencontre du RNA club de bordeaux, Bordeaux, Mars 2012 (communication en anglais).

- Aimé A., Beztsinna N., Maurel M., Grosset C., Bestel I. microRNA mimic-based nanosystem for hepatocellular carcinoma therapy. Journée jeune chercheur de la SCT (Société de Chimie Thérapeutique), Romainville, Février 2012. (communication en français).
- Aimé A., Beztsinna N., Maurel M., Grosset C., Bestel I. Auto-vectorized microRNA mimic-based nanosystem for hepatocellular carcinoma therapy. 7èmes journées du canceropôle grand sud ouest (GSO), Bordeaux, Octobre 2011 (communication en français).

### **Communications par affiche:**

- Aimé, A. Patwa, A. Gissot, C. Di Primo, C. Staedel, I. Berque-Bestel and P. Bathélémy. BIO-IMAGING: "NANAN" Multifunctional oligonucleotide-based nanoplatform. Journée jeunes chercheurs de l'IECB, Pessac, Mai 2012.
- Aimé A., Beztsinna N., Maurel M., Grosset C., Bestel I. Auto-vectorized microRNA mimic-based nanosystem for hepatocellular carcinoma therapy. Journée annuelle de l'école doctorale, Arcachon, Avril 2012.
- Aimé A., Beztsinna N., Maurel M., Grosset C., Bestel I. microRNA mimic-based nanosystem for hepatocellular carcinoma therapy. Journée jeune chercheur de la SCT (Société de Chimie Thérapeutique), Romainville, Février 2012.
- Aimé A., Beztsinna N., Maurel M., Grosset C., Bestel I. microRNA mimic-based nanosystem for hepatocellular carcinoma therapy. XVIème journées du GTRV, Bruxelles Décembre 2011.
- Aimé, A. Patwa, A. Gissot, C. Di Primo, C. Staedel, I. Berque-Bestel and P. Bathélémy. BIO-IMAGING: "NANAN" Multifunctional oligonucleotide-based nanoplatform. Journée annuelle de l'école doctorale, Arcachon, Avril 2011.
- Aimé A. ; Charles, E. ; Chapuis, H. ; Bui, L. ; Pierre, N. ; Staedel, C. ; Berque-Bestel, I. and Barthélémy, P. Oligonucléotides amphiphiles à visée thérapeutique ciblant des micro-ARNs. Journée de l'IFR 66, Talence, Décembre 2009.