Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2
Et de l'unité de recherche Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire

Spécialité : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

Présentée par KONATE Karidia

Caractérisation et optimisation des nanoparticules CADY/siRNA en vue d'une application *in vivo*

Soutenue le 27 mai 2015 devant le jury composé de

Mme Sandrine SAGAN, Directeur de recherche CNRS, UPMC	Rapporteur
Mme Véronique ROSILIO, Professeur UPSUD, Insitut Galien	Rapporteur
Mme Magali GARY-BOBO, Chargée de recherche CNRS, IBMM	Examinateur
Mr Pierre-Emmanuel MILHIET, Directeur de recherche CNRS, CBS	Examinateur
Mr Bernard LEBLEU, Professeur UM	Invité
Mme Prisca BOISGUERIN, Chargée de recherche CNRS, CRBM	Directeur de thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire dirigé par le Dr. Anne Debant à Montpellier.

Tout d'abord je tiens à remercier le Dr Gilles Divita pour avoir cru en moi et pour m'avoir encouragé à réaliser un travail de thèse. Pour cela je souhaite lui exprimer toute ma gratitude.

J'aimerais sincèrement remercier le Dr Prisca Boisguerin pour avoir accepté de reprendre la direction de ma thèse et de s'y être investie vraiment à fond. Tu as su apaiser mes doutes et m'aider à trouver des solutions aux problèmes que tout thésard peut rencontrer. Merci encore pour ta patience et ton soutien sans faille pendant la rédaction du manuscrit.

J'adresse mes remerciements aux Drs. Sandrine Sagan et Véronique Rosilio qui ont accepté d'examiner ce travail et d'être rapporteurs de ma thèse. Qu'elles trouvent ici, l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'elles ont bien voulu porter à ce travail.

Je remercie également le Pr Bernard Lebleu, le Dr Pierre-Emmanuel Milhiet et le Dr Magali Gary-bobo de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux membres de mon équipe en particulier au Dr Sébastien Deshayes. Cela fait près de 7 ans que l'on bourlingue dans cette équipe (et dans cet institut) en tant qu'ovni de biophysiciens. Je suis heureuse que nous ayons pu rester souder pour faire valoir notre science et notre savoir-faire. Tes encouragements et ta grande expertise m'ont été d'un grand secours dans la réalisation de mes travaux de thèse ainsi que pendant la rédaction. Merci beaucoup.

Je souhaite aussi remercier les Drs. Mattias Lindberg et Carole Jourdan pour leur collaboration et la réalisation des expériences in cellulo et in vivo. J'ai énormément apprécié vos conseils avisés et les discussions scientifiques que l'on a pu avoir. En tant que post-docs, vous avez été une bouffée d'oxygène dans les moments les plus dures de l'équipe et j'admire votre maturité tant professionnelle que personnelle. Je ne vous souhaite que le meilleur quel que soit la route que vous souhaitez prendre.

Puis, je remercie le Dr Nadir Bettache (actuellement parti pour de nouvelles aventures) pour sa gentillesse et son aide pour que je puisse mener à bien mon travail de thèse.

Une partie de ce travail n'aurait pas été possible sans la contribution du Dr Gudrun Aldrian pour la synthèse d'un certain nombre des peptides. Merci pour tes conseils, ta réactivité et ton soutien au quotidien.

Merci Quentin pour ta contribution lors de la rédaction et ne t'inquiètes surtout pas je te renverrais l'ascenseur quand tu rédigeras ton manuscrit.

Je suis heureuse d'avoir partagé cette aventure avec « les thésardes et thésards du CRBM» : Aude à l'amour, Mathyx, Ngox, Héiani, Priscilla, Aïcha et Daouda, je vous adore!!!

Et je souhaite tout particulièrement remercier « mes petites sœurs de cœurs », Monia et Naïma, pour leur bonne humeur au quotidien, nos délires et fous rires, nos interminables discussions qui étaient parfois tournées vers la science et non pas que sur le shopping….

J'aimerais exprimer ma reconnaissance envers nos différents collaborateurs pour leur bienveillance et pour avoir partagé leurs expertises : Dr Pierre-Emmanuelle et Cédric Godefroy au centre de biologie structurale. Le Pr Jean-marie Devoiselle, Dr Sylvie Begu et Dr Anne Aubert à la faculté de pharmacie de Montpellier.

Merci à mes collègues de la radioactivité, Cisca et Coco, pour leur patience car je n'étais pas très disponible ces derniers temps. Sans vous la radiocactivité au CRBM ne serait pas pareil ! Je remercie l'ensemble du CRBM pour les discussions avec les uns les autres : Gwenda, Véronique, Didier, Paulette, Tony, Catherine, Hélène, Géraldine, Michaël, Valérie, Sylvie, Bénédicte, Pierre, Mathieu….

Et pour finir, je remercie mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mon parcours professionnel. J'embrasse mes enfants et mon mari dont le réconfort m'a permis de supporter toutes les épreuves de la vie de thésard en particulier pendant l'écriture du manuscrit.

Merci à tous !

RESUME

Caractérisation et optimisation des nanoparticules CADY/siRNA en vue d'une application *in vivo*.

Le peptide vecteur CADY a été élaboré pour promouvoir le transport intracellulaire de petits ARN interférents (siRNA) par la formation de nanoparticules. En premier lieu, une étude de relations structure/activité sur 6 analogues de CADY a permis de confirmer que limiter le caractère amphipathique et le polymorphisme structurale des vecteurs engendrait une réduction de l'efficacité d'internalisation des nanoparticules. Ensuite, des procédures de formulation et d'extrusion/lyophilisation standardisées ont été mises au point afin d'obtenir des nanoparticules CADY/siRNA homogènes et stockables sous forme de poudre. Enfin, différentes entités ont été greffées sur la séquence de CADY afin d'apporter un ciblage cellulaire et d'améliorer la biodisponibilité (PEGylation) des nanoparticules *in vivo*. Ces modifications ne changent que faiblement les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des nanoparticules ce qui est très encourageant en vue de futures applications *in vivo*.

Mots-clés: peptides vecteurs, siRNA, nanoparticules, formulation, interaction lipidique, ciblage, PEGylation

ABSTRACT

Characterization and optimization of CADY/siRNA nanoparticles for an *in vivo* application

The CADY peptidic vector was developed to promote the transport of small interfering RNAs (siRNAs) by non-covalent strategy trough nanoparticles formation. First, we conducted a structure-activity study with six CADY-based analogs which allowed us to confirm that the reduction of the amphipathic character and structural polymorphism is directly related to the efficiency of internalization of our nanoparticles. Next, a standard procedure for formulating and extrusion/lyophilization was developed in order to obtain homogeneous CADY/siRNA nanoparticles and storable in the form of powder. Finally, different entities have been grafted on the CADY sequence to improve the specificity (cell targeting sequence) and bioavailability (PEGylation) of the *in vivo* administration our nanoparticles. These modifications have only little effects on physicochemical and biological characteristics of our nanoparticles, which is very encouraging for future *in vivo* applications.

Keywords: cell penetrating peptides, siRNA, nanoparticles, formulation, lipidic interaction, targeting, PEGylation.

SOMMAIRE

SOMMAIRE ____ *8*

ABBREVIATIONS ____ *11*

AVANT PROPOS ____ *13*

CHAPITRE 1 – Introduction ____ *16*

1. L'ARN interférent comme agent thérapeutique ____ **16**

2. Le transfert d'agents thérapeutiques *in cellulo* ____ **19**

2.1 Les membranes biologiques ____ 20

2.2 Le transport à travers la membrane plasmique ____ 23

2.2.1 Le transport passif ____ 23

2.2.2 Le transport actif ____ 25

2.2.3 Le transport par exo- et endocytose ____ 26

3. Les méthodes de transfert direct ____ **27**

3.1. Différentes méthodes d'injection ____ 27

3.2. Perméabilisation transitoire de la membrane plasmique ____ 28

4. Les méthodes basées sur l'utilisation de vecteurs ____ **30**

4.1. Vecteurs viraux ____ 30

4.1.1 Les vecteurs adénoviraux ____ 31

4.1.2. Les vecteurs rétroviraux ____ 32

4.1.3. Les vecteurs basés sur les virus associés aux adénovirus ____ 33

4.1.4 Limitations des vecteurs viraux ____ 34

4.2. Vecteurs synthétiques ____ 34

4.2.1 Les lipoplexes ____ 35

4.2.2. Les polyplexes ____ 37

4.2.3. Les Nanoparticules métalliques ____ 40

5. Peptides vecteurs ou « *cell penetrating peptides* » ____ **40**

5.1. Définition des CPPs ____ 41

5.2. Classification des CPPs ____ 42

5.2.1 Classification des CPPs en fonction de leur origine ____ 42

5.2.2 Classification des CPPs en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques ____ 47

5.3. Stratégie de délivrance ____ 50

5.3.1. Stratégie covalente ____ 51

5.3.2. Stratégie non covalente ____ 52

5.4 Mécanisme d'internalisation ____ 52

5.4.1. L'internalisation par voie d'endocytose ____ 52

5.4.2. L'internalisation par translocation directe ____ 55

5.4.3. L'internalisation récepteur-dépendante ____ 56

6. Peptides amphipatiques ____ **57**

6.1. Peptides amphipathiques primaires ____ 58

6.2. Peptides amphipathiques secondaires ____ 59

6.3 Mécanisme d'action des vecteurs peptidiques MPG/Pep-1/CADY ____ 60

CHAPITRE 2 – Auto-assemblage de CADY/siRNA ____ *62*

CHAPITRE 3 – Développement des analogues de CADY ____ *69*

1. Introduction générale ____ **69**

2. Conception des vecteurs peptidiques analogues de CADY ____ **72**

2.1. Rôle du cystéamide en position C-terminal de CADY ____ 72

2.2. Choix des analogues de CADY ____ 73

2.3. Caractérisation *in silico* des analogues de CADY ____ 77

3. Sélection des analogues pour la vectorisation de siRNA ____ **79**

3.1. Critères de solubilité des analogues de CADY ____ 79

3.2. Mesure des constantes d'affinité par fluorescence ____ 81

4. Etude comparative entre PG9, PG16 et CADY ____ **82**

4.1. Analyse de la formation des complexes CPP/siRNA ____ 82

4.1.1. Caractérisation des paramètres colloïdaux des complexes CPP/siRNA ____ 82

4.1.2. Evaluation de la stabilité des complexes CPP/siRNA ____ 83

4.2. Versatilité structurale de PG9 et PG16 en comparaison avec CADY ____ 85

4.2.1. Structure secondaire des CPPs seuls ____ 86

4.2.2. Structure secondaire des complexes CPP/siRNA ____ 88

4.3. Affinité des CPPs pour les lipides – modèle de la monocouche lipidique ____ 91

4.3.1. Estimation du caractère amphipathique des CPPs ____ 91

4.3.2. Insertion des CPPs dans des monocouches lipidiques ____ 93

5. Evaluation de l'efficacité de transfection *in cellulo* ____ **96**

6. Conclusions ____ **98**

CHAPITRE 4 – Optimisation de la formulation des nanoparticules CADY/siRNA ____ *101*

1. Introduction générale ____ **101**

2. Formulation des nanoparticules CADY/siRNA en solution ____ **103**

2.1. Formulation en condition physiologique ____ 103

2.2. Formulation en présence d'excipients ____ 107

2.3. Formulation en présence de sérum ____ 108

3. Standardisation du protocole de formulation des nanoparticules CADY/siRNA ____ **110**

3.1. Amélioration des conditions de stockage des nanoparticules CADY/siRNA ____ 111

3.2. Amélioration de l'homogénéisation des solutions de nanoparticules CADY/siRNA ____ 113

3.3. Influence de la concentration de CADY sur la formation des nanoparticules ____ 115

3.4. Etablissement et validation d'un protocole standard de formulation ____ 118

4. Ajout d'une séquence de ciblage pour une délivrance spécifique de CADY/siRNA ____ **120**

4.1. Caractéristiques biophysiques de PCY4 comparé à CADY ____ 121

4.2. Évaluation des nanoparticules PCY4/siRNA *versus* CADY/siRNA *in vitro* ____ 125

4.3 Évaluation des nanoparticules PCY4/siRNA *in cellulo* et *in vivo* ____ 127

5. PEGylation de CADY pour augmenter la demi-vie des nanoparticules CADY/siRNA ____ **129**

5.1. Versatilité structurale de CPEG ____ 130

5.2 Évaluation des nanoparticules CPEG/siRNA *versus* CADY/siRNA *in vitro* ____ 131

5.2.1 Caractérisation de la taille moyenne, de l'IP et de la charge de surface des nanoparticules CPEG/siRNA 132

5.2.2 Evaluation de la stabilité des nanoparticules CPEG/siRNA ____ 134

5.3 Évaluation des nanoparticules CPEG/siRNA *in cellulo* 135

6. Conclusions 137

CHAPITRE 5 – DISCUSSION GENERALE 139

1. Formulation de CADY/siRNA 140

2. Les analogues de CADY 141

3. Optimisation de la formulation des nanoparticules de CADY/siRNA 148

4. Fonctionnalisation de CADY par greffage de motifs spécifiques 152

5. Perspectives quant à l'utilisation des nanoparticules CADY/siRNA 158

CHAPITRE 6 – Protocoles expérimentaux 163

1. Matériel 163

1.1. Peptides 163

1.2. Les petits ARN interférants : siRNA 165

1.3. Lipides et préparation des LUVs 167

2. Modélisation des peptides vecteurs 167

2.1. « *Helical Wheel Projections* » 167

2.2. « *I-Tasser* » 168

3. Formulation des complexes CPP/siRNA 169

3.1. Mesure de l'affinité CPP/siRNA par spectroscopie de fluorescence 170

3.2. Evaluation du niveau de complexation des CPP/siRNA par électrophorèse de décalage (Gel Shift Assay) 172

4. Mesure des propriétés colloïdales par la diffusion dynamique de la lumière 172

4.1. Mesure de la taille des particules des CPP/siRNA 174

4.2. Mesure de la charge de surface des complexes CPP/siRNA 177

5. Les techniques de Langmuir pour les mesures d'interface eau/air 179

5.1. Les études d'adsorption 180

5.2. Les études d'insertion 182

6. Dichroïsme circulaire pour déterminer la conformation des CPPs 183

7. Mesure de l'activité biologique des CPP/siRNA *in cellulo* 185

7.1. Conditions de transfection des cellules 185

7.2. Mesure de la toxicité cellulaire engendrée par les complexes 186

7.3. Mesure de l'activité luciférase 186

8. Microscopie pour la visualisation des nanoparticules 188

8.1. Microscopie à force atomique 188

8.2. Microscopie électronique 189

Références bibliographiques 192

Publications et communications 222

ABBREVIATIONS

A

ARN: Acide RiboNucléique (RNA)

ARNi : interférence par ARN

C

CPP: Cell Penetrating Peptides=Peptides vecteurs

CD : dichroïsme circulaire (*circular dichroism*)

CIB : peptide de ciblage

D

DLS : diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*)

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine

DOPG : 1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycerol

E

ECD : endocytose clathrines-dépendante

EP : électroporation

G

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GAG : glycoaminoglycanes

GFP : protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*)

H

HS : héparane sulfate

HSPG : protéoglycane à héparane sulfate (*heparan sulfate proteoglycan)*

K

Kb : kilobase

Kd : constante de dissociation

L

LUV : grande vésicules unilamellaires (*large unilamellar vesicles*)

LC : liquide condensé

LE : liquide expansé

N

NLS : séquence de localisation nucléaire (*nuclear localization sequence*)

P

PEG : Polyéthylène glycol

PBS : tampon phosphate salin (*phosphate buffer saline*)

PNA : acides nucléiques peptidique (*peptidic nucleic acid*)

PTD : domaine de transduction de domaine (*protein transduction domain*)

PZ : potentiel zêta

R

RMN : résonance magnétique nucléaire

S

SM : N-octadecanoyl-D-*erythro*-sphingosylphosphorylcholine, Shingomyeline

SDS : dodécyl sulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate)

siRNA : petits ARN interférents (*small interfering RNA*)

SUV : petites vésicules unilamellaires (*small unilamellar vesicles*)

TBE : *Tris, Borate, EDTA*

U

UV : ultraviolet

T

TAT : protéine trans-activatrice de la transcription

Tat : séquence peptidique issue de la protéine TAT

ΔΠ : accroissement de pression superficielle

Πi : pression initiale en lipide

AVANT PROPOS

Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor. A l'échelle mondiale, les nanotechnologies suscitent de plus en plus d'intérêt et sont en voie de constituer le cœur de la prochaine révolution industrielle.

En parallèle, depuis l'avènement de la génomique et la compréhension de bon nombre de mécanismes intracellulaires, les chercheurs ont développé des molécules pouvant agir sur ces phénomènes en conditions pathologiques. Cependant certaines molécules sont inefficaces car elles ne sont pas capables de franchir les systèmes très complexes que sont les barrières biologiques (les fluides biologiques ou encore la membrane plasmique) séparant le site d'administration du site d'action. La délivrance ou l'adressage spécifique de molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue actuellement un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique. Actuellement la recherche médicale fondamentale se concentre autant sur la découverte d'agents thérapeutiques que sur le développement de vecteurs performants pour la délivrance de ces molécules. S'appuyant sur de nouveaux concepts physico-chimiques et sur de nouveaux matériaux issus de la nanotechnologie, la recherche a permis d'imaginer des systèmes submicroniques d'administration des médicaments. Ces champs d'application regroupés sous le nom de nanomédecine connaissent actuellement de grands progrès et devraient permettre d'améliorer la détection précoce et le traitement de nombreuses pathologies (cancers, maladies auto-immunes ou infectieuses par exemple). Le développement de ce type de vecteur constitue donc un enjeu majeur de santé publique.

Un vecteur doit être capable de protéger la molécule active de la dégradation, d'en contrôler la libération dans le temps et dans l'espace et ce sans altérer les organes sains. En fonction de la pathologie et de la cible à atteindre, les voies d'administration peuvent être orale, systémique ou même locale (yeux, peau, muscles…) et pour chaque stratégie il est nécessaire d'adapter le vecteur et sa formulation. Parmi toutes les techniques de vectorisation qui ont montré une

efficacité d'internalisation intéressante, les peptides vecteurs ont su attirer l'attention de par leur capacité intrinsèque à traverser les membranes et leur faible toxicité.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse ont pour but de mieux comprendre et d'optimiser le mode d'action du peptide vecteur CADY, conçu pour le transfert de petits ARN interférents (siRNA). Les résultats obtenus s'articulent autour de cinq chapitres :

Le premier chapitre rassemble les éléments bibliographiques sur les différentes techniques qui existent à l'heure actuelle pour transférer des oligonucléotides, des protéines ou autres drogues à l'intérieur des cellules. Ce chapitre présente plus particulièrement une catégorie de vecteurs : les peptides vecteurs ou « *cell-penetrating peptides* » (CPPs) et l'étude de leur mécanisme d'entrée dans la cellule.

Le deuxième chapitre résume les travaux effectués et publiés sur la caractérisation des nanoparticules CADY/siRNA.

Le troisième chapitre décrit l'approche biophysique utilisée afin de comparer les propriétés de CADY avec des analogues développés au sein de notre équipe. En effet, la compréhension du mécanisme de translocation de ces peptides à travers la membrane plasmique est primordiale pour leur développement et leur optimisation. En général, les études menées pour déterminer le mécanisme de translocation de vecteurs peptidiques consistent exclusivement en l'examen de l'activité cellulaire des peptides. Les aspects physico-chimiques et structuraux sont aussi étudiés et de plus en plus de travaux tentent de les relier au mécanisme de translocation. Notre travail d'investigation sur nos vecteurs consiste à déterminer leurs propriétés structurales, leur mode d'interaction avec les lipides qui constituent majoritairement la membrane plasmique, et leur aptitude à interagir avec la molécule thérapeutique qu'ils transportent. La prise en compte de l'ensemble de ces paramètres permet alors de proposer « Le » vecteur optimal pour la délivrance de siRNA.

Le quatrième chapitre s'articule autour de l'optimisation de la formulation des nanoparticules CADY/siRNA. La taille, la charge, la stabilité ainsi que l'homogénéité des particules en solution, pouvant influer sur le devenir des formulations et leur efficacité de transfection, sont des paramètres importants à déterminer. Dans un premier temps, nous avons donc souhaité évaluer l'effet de différents tampons et

concentrations de sel sur la taille moyenne de nos nanoparticules. En parallèle, l'impact de différents adjuvants, de techniques d'homogénéisation (filtration *versus* extrusion) ainsi que de lyophilisation sur la formulation de CADY/siRNA a été étudié afin d'obtenir des nanoparticules plus homogènes et stables dans le temps. Dans un second temps, une séquence peptidique de ciblage (pour une délivrance spécifique au niveau du cerveau) ainsi qu'une entité PEG (pour augmenter la demi-vie des nanoparticules durant la circulation sanguine) ont été greffés sur le vecteur CADY. Les nouveaux vecteurs résultants, PCY4 et CPEG, ont été analysés en comparaison avec CADY en termes de conformations, de formations de nanoparticules, d'interaction avec le siRNA et/ou les lipides ainsi que de potentiel de transfection *in cellulo*.

Le dernier chapitre se résume en une discussion approfondie sur les résultats obtenus en les replaçant dans le contexte actuel de la littérature sur le domaine. Ensuite, les perspectives de nos projets autour du vecteur CADY sont présentées dans le cadre de la transfection de molécules thérapeutiques telles que le siRNA.

CHAPITRE 1 – Introduction

L'évolution de la recherche sur les mécanismes moléculaires impliqués dans différentes maladies comme les maladies génétiques, les cancers ou les infections virales permet de laisser entrevoir le développement de futurs traitements spécifiques. En effet, l'analyse des gènes et protéines sollicités lors d'un dysfonctionnement cellulaire permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques. Toutefois, nombre de ces cibles se trouvent à l'intérieur de la cellule et nécessitent donc le passage des agents thérapeutiques à travers la membrane plasmique. Le transfert de molécules thérapeutiques (acides nucléiques, protéines ou peptides) à l'intérieur de la cellule, ou transfection, est donc un véritable défi. Comme la membrane cellulaire est peu perméable à ces substances actives, diverses techniques ont été développées pour permettre leur passage à travers la membrane. Il s'agit de méthodes dites « physiques » permettant la perméabilisation de la membrane ou de méthodes nécessitant l'utilisation d'un vecteur de nature chimique ou biologique. Dans les paragraphes 4 et 5 de ce chapitre, une liste non exhaustive de ces nombreuses techniques développées sera présentée avec une emphase sur les vecteurs et notamment sur les CPPs. Auparavant, nous exposerons l'intérêt d'utiliser la machinerie d'ARN interférent pour développer une stratégie thérapeutique à base de siRNA et les contraintes liées à son essor en tant qu'agent thérapeutique (cf. § 1). Puis nous ferons un rappel sur la membrane plasmique et les différents modes de transport qui organisent le passage de molécules au travers de celle-ci (cf. § 2).

Remarque : Dans notre étude, les petites substances actives chimiques ne sont pas concernées par l'appellation « agents thérapeutiques » sauf si mentionnées pour comparaison ou dans une référence.

1. L'ARN interférent comme agent thérapeutique

L'ARN interférence (ou ARNi) est un mécanisme phylogénétiquement conservé qui met en jeu des molécules d'ARN double-brin, qui vont activer la machinerie de l'épissage. Les ARN interférents seraient impliqués dans divers processus chez les

mammifères, comme la régulation de tous les ARN messager (ARNm), la défense contre les virus et la méthylation de l'ADN (1).

Le terme d'interférence par ARN a été employé pour la première fois par Andrew Fire et Craig Mello (2). En 1998, ils ont montré que l'on pouvait réduire spécifiquement l'expression de protéines contenues dans des cellules du nématode *C. elegans*, en introduisant de l'ARN double brin (dsRNA) dans celles-ci. L'ARN interférent se lie spécifiquement avec l'ARNm cible, conduisant à la dégradation de celui-ci et de ce fait à l'inhibition de l'expression de la protéine correspondante (3). Ces deux chercheurs ont reçu le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux en 2006. Depuis, notre compréhension de l'ARNi n'a cessé d'augmenter et a permis d'envisager le développement de nouvelles thérapies (4).

En à peine 15 ans, la recherche basée sur l'interférence par ARNi a non seulement permis d'élucider un grand nombre de mécanismes cellulaires fondamentaux en conditions pathologiques dans différents organismes mais aussi de développer un nouvel outil thérapeutique très spécifique, le siRNA (*small interfering RNA*). Dans la littérature, sa validité en tant que molécule thérapeutique a été démontrée pour de nombreuses maladies jusqu'à la mise en œuvre de plusieurs essais cliniques (5).

Les petits ARN interférents ou siRNA sont donc des molécules d'ARN en double brin de 21 à 23 nucléotides, qui ont la capacité de reconnaître de façon séquence-spécifique un ARNm cible et d'induire sa dégradation (Figure 1.1 (A)). Les siRNA exogènes, simples à synthétiser chimiquement, représentent des outils moléculaires puissants pour l'extinction ciblée de l'expression des gènes et sont largement utilisés pour l'étude fonctionnelle d'un gène ou le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. L'interférence par ARN est une méthode souple au niveau du choix de la séquence cible et techniquement simple à mettre en œuvre au laboratoire ce qui explique sa très grande popularité.

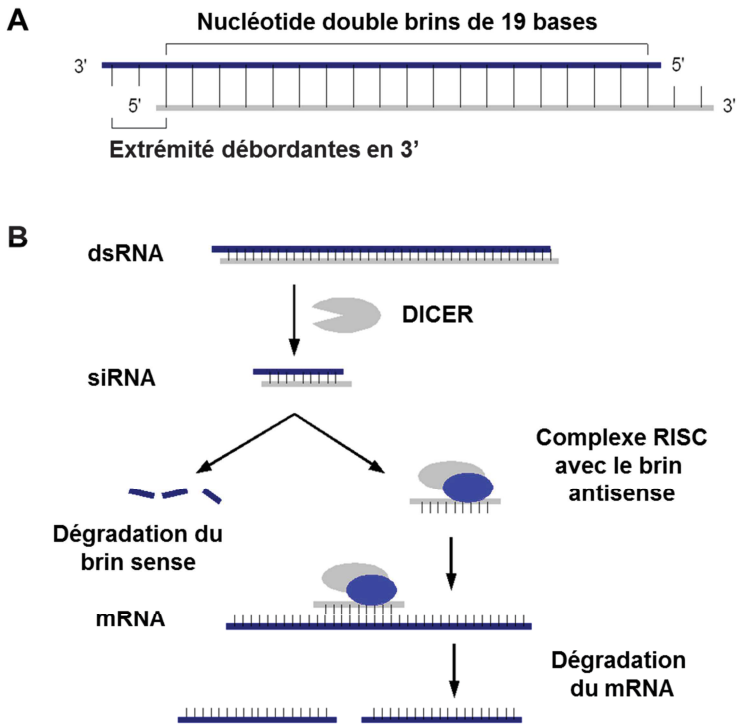


Figure 1.1 : Représentation schématique d'un siRNA (A) et de son mécanisme d'action (B).

Une fois dans la cellule, le duplexe de siRNA est pris en charge par un complexe protéique appelé RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) et dont l'activité ARN-hélicase permet de dérouler l'ARN double-brin et libérer le brin anti-sens du duplexe. Le brin anti-sens guide le complexe RISC à l'ARNm homologue cible qui est alors clivé par l'activité d'une endoribonucléase associée au complexe RISC, réduisant ainsi au silence le gène correspondant (Figure 1.1 (B)). Enfin, les nucléases dégradent les ARN simple brin et le complexe RISC est recyclé.

L'efficacité de cette stratégie dans les cellules de mammifères a été démontrée pour la 1ère fois en 2001 (6). Le potentiel thérapeutique de l'ARNi n'a été démontré qu'en 2002 à l'aide de souris transgéniques exprimant la GFP (pour *green fluorescence protein*). L'injection en intraveineux de siRNA ciblant la GFP a induit une forte inhibition de l'expression de la protéine fluorescente (7). Cette année-là, la revue Science a même qualifié le siRNA de « molécule de l'année » (8).

Les avantages de cette stratégie résident dans le fait que les siRNA peuvent être produits facilement et en grande quantité. Néanmoins, l'utilisation des siRNA comme

outils thérapeutiques *in cellulo* et *in vivo* est limitée par leurs caractéristiques physico-chimiques. En effet, les siRNA sont des macromolécules polyanioniques, dont les charges négatives sont défavorables à leur entrée par voie passive dans la cellule. De plus ils sont aussi limités par leur faible biodisponibilité liée à leur dégradation due aux nucléases et une élimination rapide *in vivo* (5,9–11). Il existe actuellement toute une panoplie de techniques pour transfecter les siRNA *in cellulo* et améliorer leur circulation *in vivo* (12). L'application de ces techniques peut être élargie à l'ensemble des macromolécules thérapeutiques dont les propriétés physico-chimiques empêchent leur passage à travers la membrane plasmique.

2. Le transfert d'agents thérapeutiques *in cellulo*

Le transfert d'agents thérapeutiques consiste à faire entrer ces molécules à l'intérieur de la cellule. Et ce, dans le but d'étudier dans les cellules vivantes des processus intracellulaires, de régulation de fonctions cellulaires et/ou de traitement de certaines maladies. Actuellement, le transfert de gènes, ou plus généralement la thérapie génique, consiste plus spécifiquement à transférer des acides nucléiques exogènes dans les cellules en vue du traitement de maladies comme les cancers et les maladies génétiques. Dans les premiers temps, le développement de la thérapie génique impliquait principalement l'ADN. A présent, elle englobe aussi l'ARN et toutes sortes d'oligonucléotides comme médicaments (13,14). En fonction des pathologies, diverses stratégies faisant intervenir différents agents thérapeutiques peuvent être envisagées :

- La première stratégie consiste à remplacer un gène déficient par son homologue fonctionnel. Celle-ci implique que la maladie à traiter soit due à une anomalie de faible ampleur sur un seul chromosome, qu'on puisse cibler le gène en question avec un gène réparateur et que ce dernier puisse s'insérer dans le génome des cellules. Cette stratégie n'est pas envisageable dans l'état actuel des connaissances.

- La seconde stratégie consiste à ajouter un gène dans le génome de l'hôte. Ce gène peut s'insérer (au hasard) ou non dans le génome. Il permet la production d'une protéine thérapeutique ou antigénique.

- La troisième stratégie, en pleine expansion, consiste au contraire à réguler l'expression d'un gène endogène, impliqué dans une pathologie par des oligonucléotides. L'oligonucléotide véhiculé (siRNA, miRNA etc.) permet ici d'inhiber ou de restaurer la production de la protéine correspondante en ciblant l'ARNm.

Dans le cadre du transfert d'oligonucléotides thérapeutiques, la faible perméabilité et la sélectivité de la membrane cellulaire représentent les principales limitations pour l'internalisation de ces molécules thérapeutiques. Dans ce contexte, ce chapitre commencera par une description des membranes biologiques et des différents mécanismes naturels permettant l'entrée de ces molécules exogènes. Nous donnerons par la suite un aperçu des différentes méthodes existantes à l'heure actuelle pour le transfert de molécules dans les cellules.

2.1 Les membranes biologiques

Les membranes biologiques sont les premières barrières rencontrées par les molécules thérapeutiques lorsque celles-ci doivent atteindre une cible intracellulaire. Elles représentent un ensemble complexe de lipides, de protéines et de sucres régulant les échanges de molécules biologiques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. On parle de membrane plasmique lorsqu'elle délimite la cellule et d'endomembrane quand il s'agit de compartiments intracellulaires (mitochondrie, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes, etc.). Dans ce paragraphe, nous nous attacherons plus particulièrement à décrire le fonctionnement de la membrane plasmique.

Les membranes plasmiques sont composées d'un mélange de phospholipides (glycérophospholipides et sphingomyélines) associés à des glycosphingolipides (cérébrosides et gangliosides), des stérols (cholestérol) et des protéines.

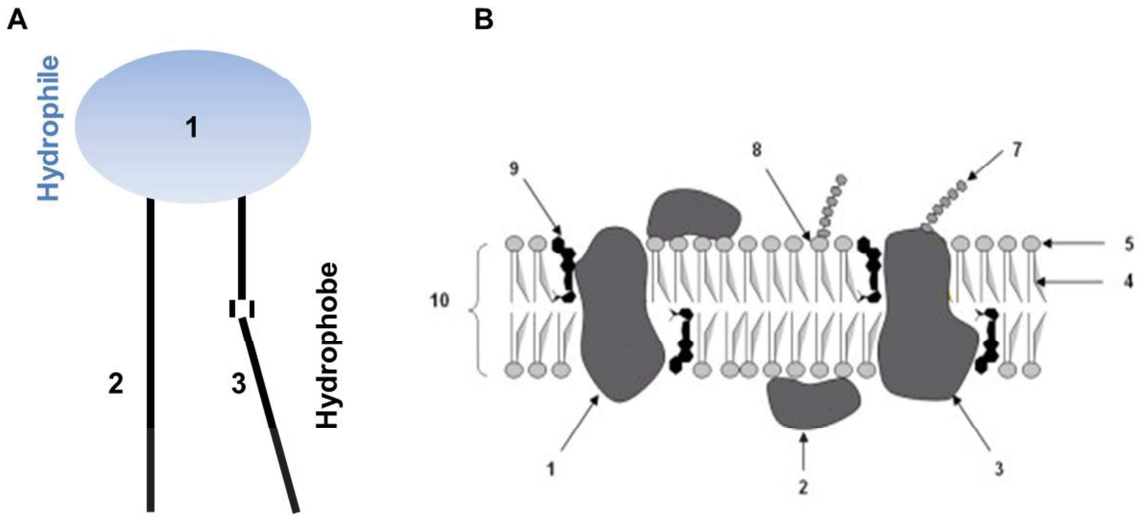


Figure 1.2 : **Représentation schématique d'un phospholipide et de la membrane plasmique. (A)** Le phospholipide est constitué d'un pôle hydrophile comprenant une tête polaire associée à un groupement glycérol (1) et d'un pôle hydrophobe comprenant deux chaînes alkyles qui peuvent être saturées (2) ou insaturées (3). **(B)** la membrane plasmique est constituée d'une bicouche (10) de phospholipides (pôles hydrophobe (4) et hydrophile (5)) parfois glycosylés (8) dans laquelle s'imbriquent des molécules de cholestérol (9). Cette bicouche lipidique est associée à des protéines qui sont transmembranaires (1) ou périphériques (2) et peuvent être glycosylées (3). La glycosylation consiste à associer un sucre à une molécule de manière covalente (7).

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles constituées d'un groupement polaire et de chaînes hydrophobes d'acides gras (Figure 1.2 (A)). En détail, leur pôle hydrophile se compose d'un groupement phosphate lié à une molécule qui confère une identité propre au lipide (choline, glycérol, éthanolamine, etc). Cette tête polaire est reliée à deux chaines hydrocarbonées hydrophobes par l'intermédiaire d'une molécule de glycérol. Ces chaînes d'acides gras peuvent être saturées ou insaturées (avec des doubles liaisons). Lorsque les phospholipides se trouvent en milieu aqueux, ils s'organisent de façon à minimiser les interactions entre les chaînes hydrocarbonées et les molécules d'eau, adoptant par auto-assemblage moléculaire une configuration en bicouche. Les têtes polaires sont alors en contact avec l'eau tandis que les queues aliphatiques se rassemblent pour former un cœur hydrophobe, cette disposition des lipides étant la plus thermodynamiquement favorable (Figure 1.2 (B)). De plus, la bicouche lipidique est asymétrique c'est-à-dire que la composition lipidique des feuillets est différente. Le feuillet externe est riche en phosphatidylcholine (PC) tandis que les phosphatidylsérine (PS),

phosphatidylethanolamine (PE) et phosphatidylinositol (PI) se concentrent dans le feuillet interne (15). Cette asymétrie est primordiale pour de nombreuses fonctions cellulaires telles que la stabilité mécanique de la membrane, la modulation de l'activité de protéines membranaires, la génération de vésicules de sécrétion et l'apoptose.

Les membranes biologiques contiennent des protéines qui portent la plupart des fonctions spécifiques de la membrane (Figure 1.2 (B)). Elles sont de tailles et de structures différentes et peuvent être glycosylées. On définit trois classes de protéines :

- Les protéines associées à la surface lorsqu'elles sont ancrées à la membrane par l'intermédiaire d'un lipide ou d'un glucide.

- Les protéines périphériques (ou protéines membranaires extrinsèques) lorsqu'elles sont partiellement en contact avec la zone hydrophobe de la membrane.

- Les protéines transmembranaires (ou protéines membranaires intégrées) lorsqu'elles traversent entièrement la bicouche lipidique. Certaines protéines transmembranaires sont spécialisées dans le passage d'ions spécifiques à travers la membrane, ce sont les canaux ioniques qui forment un pore permettant une diffusion libre de toutes molécules de tailles et de charges appropriées.

Les membranes sont des entités dynamiques : les lipides possèdent un certain degré de liberté dans le plan de la membrane avec une vitesse de diffusion très élevée. Ils assurent la fluidité des membranes leur donnant une grande souplesse structurale et une grande résistance mécanique. En effet, la température physiologique est favorable aux rotations autour des doubles liaisons des chaines hydrocarbonées ce qui diminue les interactions de Van Der Waals stabilisant une conformation figée des chaînes alkyles (16). A l'inverse, la présence de cholestérol rigidifie la membrane (17–19), sa structure s'intercale facilement entre les chaînes alkyles empêchant par encombrement stérique les mouvements autour des doubles liaisons des chaines insaturées.

Le modèle de mosaïque fluide décrit en 1972 (20) est toujours d'actualité mais il a été renforcé au cours des années par des notions complémentaires dont :

- La notion de flip-flop des lipides : un phospholipide peut passer d'un feuillet à l'autre de la membrane. C'est le seul mouvement demandant de l'énergie car le pôle hydrophile passe dans la partie hydrophobe de la membrane. De plus, cela casse la fluidité membranaire. Ce phénomène est catalysé par deux enzymes nommées *flippase* et *floppase* (21). Le transfert de lipides au travers de la bicouche est nécessaire dans la synthèse des membranes, car les phospholipides sont apportés au feuillet intérieur et doivent passer au feuillet extérieur.
- La notion de radeau lipidique : la répartition asymétrique de certains lipides dans le plan latéral des membranes crée des microdomaines (10 et 200 nm) particuliers sous forme de phase liquide ordonnée (ou condensée) dans un environnement membranaire plus fluide. Dans cette zone de la membrane se concentrent le cholestérol, les glycosphingolipides, les sphingomyélines et les glycérophospholipides insaturés (22).
- La notion d'association du cytosquelette avec la membrane : l'association entre les protéines transmembranaires et celles du cytosquelette (par exemple l'actine) permet de faire un lien entre des mouvements intracellulaires (les phénomènes de transduction de signal, d'activation ou de différenciation cellulaire) et le milieu extracellulaire (23).

2.2 Le transport à travers la membrane plasmique

Le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique inhibe fortement le mouvement des molécules polaires ou chargées à travers la membrane. Cependant, plusieurs processus permettent l'entrée de petites molécules et de macromolécules à l'intérieur des cellules. On distingue le transport passif à travers les membranes plasmiques du transport actif.

2.2.1 Le transport passif

Le transport passif est un transport qui se fait sans consommation d'énergie, il s'agit d'une diffusion à travers la bicouche lipidique qui se fait selon un gradient de concentration et/ou un gradient électrochimique lorsque la molécule est chargée

(Figure 1.3 (A)). Il permet par un phénomène d'osmose d'équilibrer les concentrations des molécules qui traversent de part et d'autre de la membrane. Il existe 2 types de transport passif : la diffusion simple (ou diffusion libre) et la diffusion facilitée.

La diffusion simple est un processus non sélectif permettant le passage de molécules à travers la membrane plasmique selon le gradient de concentration. Ce type de passage n'est possible que si la molécule est « soluble » dans la membrane phospholipidique, c'est-à-dire qu'elle peut traverser directement la bicouche de phospholipides. La molécule doit donc être hydrophobe et être suffisamment petite (poids moléculaire <500 g/mol).

La diffusion facilitée quant à elle, se fait par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire, transporteuse ou canal. Les molécules à transporter ne sont donc pas en contact direct avec les lipides, ce qui donne la possibilité aux molécules hydrophiles de traverser la membrane. Le transport par diffusion facilitée nécessite l'interaction entre la molécule à transporter et la protéine de transport. La liaison du ligand induit un changement conformationnel du transporteur. Ce changement de structure provoque le déplacement du transporteur avec le ligand dans la membrane de telle façon qu'il oriente ce dernier vers le milieu intracellulaire. Une fois tournée vers le milieu interne de la cellule, la molécule transportée est relarguée puis le transporteur retrouve sa conformation de départ. Les transporteurs passifs déplacent les molécules de chaque côté de la membrane selon un gradient de concentration. La diffusion facilitée peut aussi solliciter l'aide d'une protéine canal formant un pore à travers la membrane plasmique par lequel diffuse librement la molécule transportée. Contrairement à la protéine transporteuse, la protéine canal ne change pas de forme.

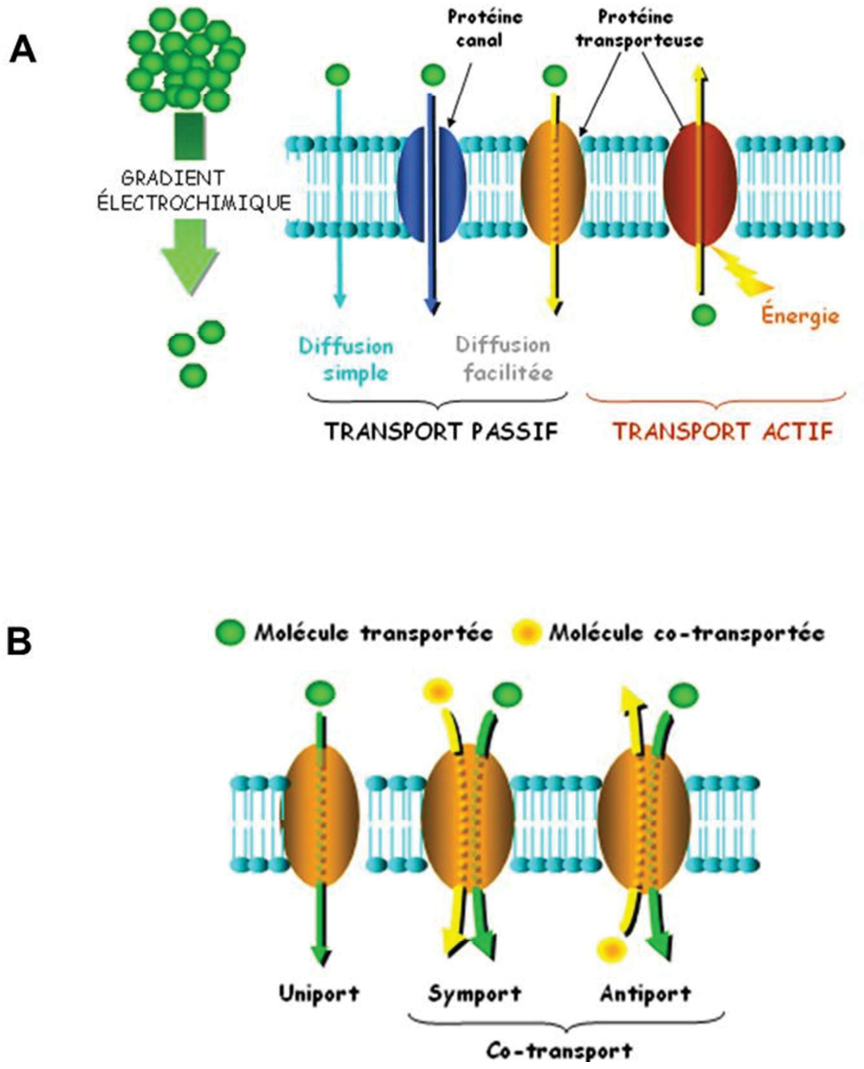


Figure 1.3 : Schéma des différents modes de transports à travers la membrane plasmique. (**A**) Différence entre le transport passif et le transport actif. (**B**) Type de protéines transporteuses. (Figure adaptée de www.FacBio.com.)

2.2.2 Le transport actif

Contrairement aux canaux et à la diffusion passive, le transport actif nécessite de l'énergie (Figure 1.3 (A)). En effet le transport actif permet de déplacer des molécules contre un gradient de concentration.

Le **transport actif primaire**, aussi appelé transport actif direct, utilise de l'énergie fournie directement par l'hydrolyse d'un nucléoside triphosphate (ex. ATP) pour transporter des molécules à travers la membrane. La plupart des enzymes qui

réalisent ce genre de transport sont des ATPases transmembranaires (ex. Na^+-K^+ ATPase).

Le **transport actif secondaire** n'utilise pas l'énergie qui lui est directement fournie comme lors de l'hydrolyse de l'ATP, mais un gradient électrochimique préalablement généré par un transport primaire comme source d'énergie. En effet, si le même soluté est transporté cette fois dans le sens de son gradient de concentration, l'énergie qui est libérée peut-être utilisée pour transporter un autre soluté. Ce type de transport permet de déplacer du glucose, des acides aminés, etc. Les deux principales formes sont le symport (ex. echangeur sodium-calcium) et l'antiport (ex. pyruvate translocase) et sont présentées sur la Figure 1.3 (B).

2.2.3 Le transport par exo- et endocytose

Deux processus différents permettent l'échange de macromolécules entre les domaines intra et extracellulaires. Le premier est l'exportation de macromolécules hors de la cellule par la voie de l'exocytose. Le second est l'importation de macromolécules à l'intérieur de la cellule par la voie de l'endocytose. L'exocytose et l'endocytose sont des mécanismes de transports actifs de la cellule (24).

Il existe deux formes d'exocytose, régulée ou constitutive. L'exocytose dite régulée est déclenchée par l'ion calcium. Elle est principalement utilisée par la cellule pour sécréter des hormones ou des neurotransmetteurs. Le transfert vers la membrane plasmique puis vers le milieu extracellulaire s'effectue par un système vésiculaire. La fusion des vésicules avec la membrane et la libération des macromolécules secrétées sont prises en charge par plusieurs protéines (25). Tandis que l'exocytose constitutive est réalisée par toutes les cellules et permet la libération de composants de la matrice extracellulaire ou simplement la livraison de protéines membranaires nouvellement synthétisées qui seront incorporées dans la membrane cellulaire au moment de la fusion de la vésicule de transport.

L'endocytose est un processus cellulaire qui permet l'importation de substances du milieu extracellulaire vers le cytoplasme par invagination de la membrane plasmique

et formation de vésicules intracellulaires. Cependant, il n'existe pas un seul et unique mécanisme d'endocytose. En effet, plusieurs processus différents ont été décrits : la phagocytose et les processus de pinocytose dont la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante (ECD), l'endocytose cavéoline-dépendante, et l'endocytose indépendante des clathrines et cavéolines (26).

3. Les méthodes de transfert direct

Le transfert direct d'une molécule exogène dans une cellule peut être effectué de différentes façons. Il peut être réalisé par action mécanique *via* l'injection de molécules directement dans le compartiment subcellulaire ciblé ou par perméabilisation transitoire de la membrane plasmique.

3.1. Différentes méthodes d'injection

Différentes techniques d'injection développées pour l'ADN nu ont pu être adaptées pour l'internalisation cellulaire du siRNA (27):

- La micro-injection est une technique qui utilise des micropipettes en verre pour injecter les acides nucléiques directement à l'intérieur du noyau ou du cytoplasme de cellules adhérentes (28).
- La « *jet injection* » est une méthode d'administration locale ne faisant pas appel à une aiguille. Un liquide contenant les acides nucléiques est envoyé sous forme d'un jet à haute pression sur le tissu ciblé (29).
- Le « canon à ADN » ou « *gene gun* » est une projection directe de l'acide nucléique adsorbé sur des microparticules inertes (en or ou en tungstène) de 1 µm à 5 µm de diamètre. Les particules sont propulsées à l'aide d'un gaz à une vitesse permettant la pénétration cellulaire. Initialement développé pour les cellules végétales (30) des applications sur cellules de mammifères ou *in vivo,* plus particulièrement par voie transdermale, ont pu être réalisées (31).

– L'injection hydrodynamique consiste à injecter un grand volume d'une solution isotonique d'acide nucléique. L'excès de liquide induit une surpression qui perméabilise l'endothélium capillaire ainsi que les hépatocytes et permet le passage de l'oligonucléotide (32).

3.2. Perméabilisation transitoire de la membrane plasmique

Certaines méthodes de transfert direct utilisent des impulsions électriques, d'ultrasons ou de laser contrôlées pour perméabiliser la membrane plasmique. Le transfert d'une molécule d'intérêt est alors effectué par voie passive à travers les pores formés. Le paramètre critique de cette méthode est la survie cellulaire. Trois méthodes de perméabilisation transitoire de la membrane plasmique sont détaillées dans ce paragraphe :

L'électroporation (EP), développée dans les années 1960 (33), est la technique la plus couramment utilisée pour perméabiliser les membranes cellulaires. Le principe de l'électroporation consiste à appliquer une impulsion électrique de haut voltage pendant quelques microsecondes pour perméabiliser la membrane plasmique. Les pores créés permettent l'entrée dans le cytoplasme de molécules chimiques mais aussi d'oligonucléotides. Le mécanisme de transfert du siRNA par EP est décrit comme une migration électrophorétique vers la cathode à travers la membrane qui a lieu au moment du *pulse* électrique et qui permet un passage de l'oligonucléotide. On observe ainsi une localisation cytoplasmique uniforme du siRNA (34,35). L'EP marche aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, son application sur des tissus dit accessibles comme la peau rend son utilisation très avantageuse dans des cas de mélanomes (34) toutefois son application sur des organes internes reste possible notamment sur le rein, le foie, les muscles de même ainsi que sur des masses tumorales. Cependant, les pores formés sont responsables de la mort d'environ 50% des cellules transfectées après EP (36). Aujourd'hui l'amélioration de cette technique repose essentiellement sur la balance entre différents paramètres : l'intensité, la

fréquence, la durée du champ électrique, le nombre de *pulse*s, le type d'électrode, et le tissu ciblé.

La sonoporation utilise les ultrasons pour perméabiliser la cellule et permettre l'entrée d'acides nucléiques. Pour une déstabilisation efficace de la membrane, l'introduction de microbulles contenant un gaz inerte est importante. La membrane qui couvre les microbulles peut être constituée de phospholipides, d'albumine dénaturée ou de polymères biodégradables. Par un phénomène de « cavitation acoustique », ces microbulles vibrant sous l'impulsion des ultrasons vont croitre jusqu'à l'implosion entrainant une augmentation thermique et des forces de cisaillement qui vont perturber les membranes (37). Les microbulles peuvent être co-injectées avec l'acide nucléique ou modifiées à leur surface (introduction de lipides cationiques lors de leur formation) pour porter l'oligonucléotide directement à l'intérieur de la cellule (38). En utilisant des microbulles modifiées avec du siRNA ciblant les récepteurs d'androgène, l'emploi d'ultrasons montre son efficacité dans la réduction de tumeur de cancer de la prostate de souris xénogreffées (39) mais aussi dans la réduction de la réponse immunitaire (40). Si la méthode s'applique *in vitro* elle a aussi l'avantage d'être non invasive *in vivo* avec des applications aux organes ou tissus accessibles pour un diagnostic échographique, comme le cœur, les muscles ou les tumeurs (41). Comme pour l'électroporation, la maîtrise de paramètres techniques tels que l'intensité, la fréquence des ultrasons ainsi que la durée d'exposition sont importants pour contrôler le niveau de perméabilisation membranaire.

Une autre technique de perméabilisation membranaire basée sur l'application d'un laser femtoseconde à pulse dans le proche infrarouge est en plein essor, c'est la transfection optique. Ce procédé, non invasif et aseptique, offre la possibilité d'une transfection cellulaire unique puisque la technique est compatible avec les microscopes optiques. Clark et coll. ont pu montrer une efficacité de transfection satisfaisante ainsi qu'une faible toxicité pour de nombreuses molécules (plasmides, siRNA, sondes fluorescentes etc.) sur différentes lignées cellulaires même difficiles à transfecter par des techniques de vectorisation classiques (42). La technique peut aussi s'appliquer *in vivo*, une preuve de concept effectuée avec la protéine « *green*

fluorescence protein » (GFP) sur des embryons de poisson zèbre donne des résultats encourageants avec 78% d'efficacité de transfection et 89% de survie (43). De même que pour les autres techniques de perméabilisation, le paramétrage (longueur d'onde du laser, nombre de pulses, fréquence) est important et influe directement sur l'efficacité de transfection et la mort cellulaire engendrée (43).

4. Les méthodes basées sur l'utilisation de vecteurs

A l'opposé des méthodes physiques de transfert de molécules actives que représentent les techniques de micro-injection, électroporation ou autres méthodes de perméabilisation, il existe d'autres approches basées sur l'utilisation de vecteurs pour le transfert intracellulaire de molécules d'intérêt. A l'heure actuelle, il existe une multitude de vecteurs différents que l'on peut aisément classer en deux catégories : les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques.

4.1. Vecteurs viraux

La vectorisation à l'aide de vecteurs viraux utilise des virus modifiés génétiquement, dits sécurisés, pour transférer un gène thérapeutique dans les cellules humaines à la place de leur propre matériel génétique. Les vecteurs viraux les plus communs sont basés sur les adénovirus, les rétrovirus et les virus associés aux adénovirus ou le virus de l'herpès (44,45). Dans tous les cas, les vecteurs utilisés font l'objet d'une ingénierie importante pour annuler leur potentiel toxique et, lorsque cela est nécessaire, pour les rendre les plus silencieux possibles vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte afin de permettre une correction thérapeutique à long terme. Actuellement, la majorité des essais cliniques en thérapie génique mettent en jeu des vecteurs viraux, près de 67% contre 17,8% pour l'ADN nu ou sous forme de plasmide et seulement 6,4% des essais mettent en œuvre un vecteur non viral (Figure 1.4). Il est à noter que les vecteurs viraux, représentés le plus souvent par la classe des adénovirus, ont démontré une efficacité certaine dans le transfert de gènes. On peut citer les exemples de Gencidine® et de Glybera®, les seuls

médicaments disponibles en thérapie génique et qui sont basés sur les adénovirus. Gencidine®, a obtenu une autorisation de mise sur le marché chinois en 2005 pour le traitement de cancers du cou et de la tête par l'introduction d'un gène suppresseur de tumeur, p53 (46). Tandis que le Glybera® est disponible uniquement en Europe (autorisation donnée par l'EMA en 2012) pour le traitement d'une inflammation pancréatique d'origine génétique due au déficit d'une enzyme, la lipoprotéine lipase (47).

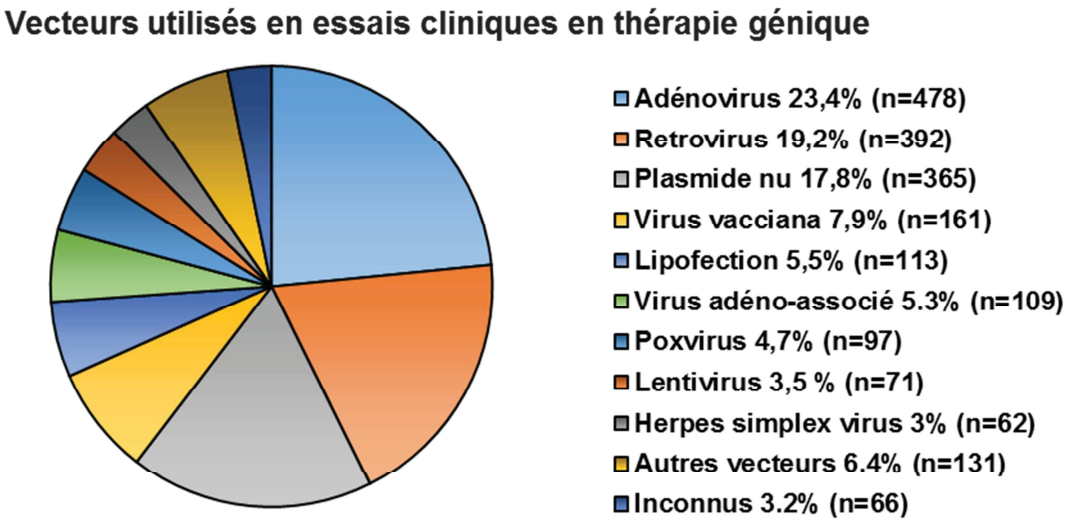


Figure 1.4 : Répartition des essais cliniques en thérapie génique par vecteurs à travers le monde. Figure adaptée de *http://www.abedia.com/wiley*.

4.1.1 Les vecteurs adénoviraux

Les adénovirus sont des virus sans enveloppe dont le génome est un ADN double brin. L'ADN est contenu dans une structure protéique à symétrie icosaédrique, la capside. Lors de l'infection de la cellule, l'ADN de l'adénovirus accède au noyau où elle est directement prise en charge par la machinerie transcriptionnelle de la cellule. L'ADN ne s'intègre pas au génome cellulaire et a donc tendance à disparaître au fil des divisions cellulaires. Les adénovirus sont capables d'infecter un grand nombre de cellules qu'elles soient en division ou non.

Les vecteurs adénoviraux dérivent en général des sérotypes humains Ad2 et Ad5. En raison de la taille importante du génome viral (environ 36 kb), l'élaboration des vecteurs adénoviraux nécessite plusieurs étapes de recombinaison homologue entre le gène thérapeutique et le génome viral. L'utilisation de vecteurs adénoviraux permet de transférer des gènes de larges séquences d'ADN (jusqu'à 30 kb) avec un taux de transduction (transfert de séquences d'ADN entre différents génomes cellulaires par l'intermédiaire d'un virus) très élevé. Cependant, il existe plusieurs inconvénients à l'utilisation des adénovirus. Tout d'abord, ils peuvent provoquer de fortes réactions inflammatoires et immunitaires (48). Ensuite, la courte durée d'expression (15 jours maximum) nécessite une administration répétée des doses. Enfin, les adénovirus humains sont assez souvent neutralisés par les anticorps préexistants chez l'homme. Pour remédier à ce problème les atadénovirus ovins, cousins des adénovirus, peuvent être utilisés (49,50).

Cependant, les vecteurs adénoviraux restent, malgré certains inconvénients, des outils importants pour explorer les questions de tropisme et d'expression réglable et, surtout, ils ont ouvert la porte à plusieurs essais cliniques de thérapie génique depuis le début des années 90 (51).

4.1.2. Les vecteurs rétroviraux

Les rétrovirus sont des virus à enveloppe dont le génome est un ARN simple brin non segmenté présent sous forme de deux copies dans la particule virale. Quand le rétrovirus infecte une cellule cible, son ARN génomique est rétro-transcrit en ADN double brin par la transcriptase inverse dans le cytoplasme. L'ADN est ensuite intégré au génome de la cellule. Les rétrovirus ne peuvent accomplir ce processus que lorsque la membrane nucléaire est rompue au moment de la mitose (52). Ils ne peuvent donc effectuer leur cycle réplicatif que dans des cellules en division. Après l'intégration dans le génome de la cellule, l'ADN rétroviral est pris en charge par la machinerie transcriptionnelle cellulaire.

Les vecteurs rétroviraux dérivent des rétrovirus leucémogènes murins (MLV) ou oncorétrovirus et pour la majorité d'entre eux, du virus de Moloney (53,54). Les

vecteurs sont assemblés à partir de rétrovirus dans lesquels l'ARN viral est remplacé par un gène thérapeutique. Ce type de vecteur présente une haute efficacité de transduction *ex vivo* et une faible immunogénicité. De plus, l'intégration dans le génome cellulaire permet une expression prolongée du gène. Ces nombreuses qualités ont conduit à plusieurs essais cliniques et de nombreuses applications (55,56). Cependant, il y a plusieurs inconvénients à l'utilisation de rétrovirus. L'efficacité de transduction *in vivo* est beaucoup plus faible. La taille du gène inséré est limitée à 8 kb maximum. Le transfert du gène est restreint aux cellules en mitose. De plus, il existe un risque de mutation suite à une mauvaise insertion (par exemple, intégration dans un gène suppresseur de tumeur et inactivation de celui-ci) (57).

Les recherches actuelles se tournent vers une autre famille de rétrovirus, les lentivirus (tels que le virus de l'immunodéficience humaine -VIH) qui sont capables d'infecter des cellules ne se divisant pas. Le vecteur lentiviral est un système hybride combinant une partie (non dangereuse) du génome du virus parental VIH avec une protéine d'enveloppe différente de celle de VIH. Actuellement les vecteurs rétroviraux représentent près de 19% des vecteurs viraux utilisés dans les protocoles cliniques.

4.1.3. Les vecteurs basés sur les virus associés aux adénovirus

Les virus associés aux adénovirus (AAV) sont des virus non enveloppés à ADN simple brin d'environ 4,7 kb. Ils sont non pathogènes et très répandus chez l'homme. Ce type de virus est naturellement déficient pour les gènes de protéines de réplication et de protéines de capside. Il doit donc être aidé par un adénovirus ou par le virus de l'herpès pour se répliquer. En absence de virus « *helper* », ce type de virus s'intègre spécifiquement sur le bras court du chromosome 19 de la cellule et reste latent à l'état de provirus jusqu'à ce que la cellule soit infectée par un adénovirus. Les vecteurs basés sur les AAV présentent une grande efficacité de transduction pour un nombre important de lignées cellulaires et un faible pouvoir immunogène. Par ailleurs, l'expression obtenue avec ces vecteurs est très longue *in vivo* (58). En revanche, l'un des inconvénients à l'utilisation des AAVs est la limitation de la taille du gène inséré qui ne peut excéder 5 kb (59). A ce jour, l'AAV semble un vecteur d'avenir pour les maladies chroniques telles que l'hémophilie et l'anémie car

son expression est durable (60). Le vecteur AAV a aussi été utilisé comme outil thérapeutique dans la dystrophie musculaire de Duchenne (61).

4.1.4 Limitations des vecteurs viraux

Globalement, malgré le fort potentiel des vecteurs viraux dû à leur capacité naturelle à s'insérer dans les cellules et leur grande efficacité de transfection *in vivo,* les vecteurs viraux présentent un certain nombre de limitations (14,62) dont les principaux sont :

- L'immunogénicité induite par l'introduction du virus lui même
- La taille limitée du gène à internaliser
- La production du virus à grande échelle difficile et coûteuse
- Les phénomènes de carcinogénèse délicats à prévoir

Pour ces raisons, la recherche se concentre de plus en plus sur des stratégies de délivrance basées sur des vecteurs non viraux, les vecteurs synthétiques.

4.2. Vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques sont de nature très variée (lipidique, polymérique, peptidique etc.) et sont capables d'internaliser de nombreuses molécules thérapeutiques ou même diagnostiques (oligonucléotides, petites drogues, protéines, sondes fluorescentes etc.). Dans le cadre du transfert d'oligonucléotides, la plupart des stratégies de vectorisation synthétiques sont actuellement basées sur la formation de nanoparticules à partir d'interactions électrostatiques entre l'acide nucléique chargé négativement et le vecteur cationique (63,64). Les paragraphes suivants traitent des principaux vecteurs cationiques décrits dans la littérature et du fort potentiel que représente le système de nanoparticules pour la délivrance du siRNA.

4.2.1 Les lipoplexes

Les lipoplexes sont constitués d'un condensat de lipides cationiques (liposomes) dans lequel s'intercale les acides nucléiques formant des particules stables de tailles comprises entre 100 nm et 300 nm. Cette construction lipidique a pour rôle de protéger l'agent thérapeutique et de l'acheminer jusqu'à sa cible intracellulaire. L'utilisation de liposomes comme méthode de délivrance est aujourd'hui une des techniques de délivrance la plus mature impliquée dans un nombre important d'essais cliniques (65). Le liposome est le premier exemple de nanoparticules approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour la délivrance de la doxorubicine, un anticancéreux puissant sous le nom de Doxil® (66).

De nos jours, les lipides cationiques sont les plus étudiés car ils ont une forte affinité avec les groupements phosphates négatifs des acides nucléiques par interactions électrostatiques (67). Ils sont généralement composés de 3 domaines :

- Une tête polaire hydrophile chargée positivement contenant le plus souvent une ou plusieurs fonctions amines. En fonction de ce nombre de charges, les lipides sont dits monocationiques ou polycationiques.
- Un bras espaceur ou *linker* dont la taille et la nature vont moduler les propriétés du lipide. Par exemple les lipides pH-sensibles contiennent en tant que *linker* des amines tertiaires ou des carbamates qui vont leur permettre de réagir au pH acide dans certaines conditions physiologiques (endosomes) ou pathologiques (tumeurs, inflammations) (5). Le *linker* peut aussi permettre l'introduction de nouvelles fonctions pour le ciblage ou pour améliorer le trafic intracellulaire.
- Un domaine hydrophobe qui est souvent composé de deux chaines aliphatiques saturées, insaturées (le dioléyl est très souvent représenté) ou d'un motif cholestérol.

Le premier lipide cationique synthétique décrit dans la littérature est monocationique, il s'agit du chlorure de N-[1-(2, 3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium (DOTMA) (68). Le lipide polycationique N,N-dimethyl-N-[2-(sperminecarboxamido)-ethyl]-2,3-bis (dioleyl-oxy)-1-propaniminium-pentahy-drochloride (DOSPA) est quant à lui commercialisé sous le nom de Lipofectamine^{TM} lorsqu'il est combiné avec le

dioléoylphosphatidyl-éthanolamine (DOPE) (69) - il est aujourd'hui utilisé comme référence lors de l'évaluation *in vitro* de nouveaux agents de transfection.

Comme toutes molécules de délivrance, les lipoplexes rencontrent les mêmes problématiques concernant le relargage des endosomes (suite à l'internalisation par voies d'endocytose), les réactions inflammatoires ou la spécificité tissulaire (67). Améliorer la chimie des lipides cationiques pour continuer leur développement en tant que vecteur de siRNA semble donc essentiel, comme par exemple l'association d'un motif PEG au lipide pour augmenter la circulation du lipoplexe et réduire la réponse immunitaire (64,70). Récemment une nouvelle classe de vecteurs lipidiques biodégradables et non toxiques, les SNALPs pour particules stables de lipide et d'acide nucléique (*stable nucleic acid lipid particles*) semble pouvoir réduire ces inconvénients. Cet assemblage de taille inférieure à 200 nm (14) est une combinaison de lipides neutres et cationiques écrantés par des PEG (Figure 1.5) :

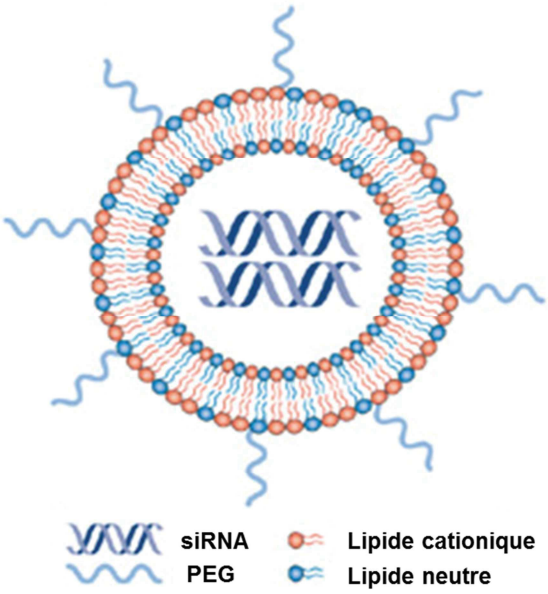


Figure 1.5 : Schéma de la structure du SNALPs. Adapté de (9)**.**

A travers plusieurs exemples les SNALPs ont montré leur potentiel en tant que vecteur tout en étant biocompatibles et peu toxiques. Dans le cadre d'une thérapie contre le virus Ebola, les SNALPs ont transféré du siRNA dirigé contre les protéines virales (71). Dans le traitement de myélomes multiples les SNALPs ont été fonctionnalisés par de la transferrine dont le récepteur est surexprimé dans ce type

de pathologie améliorant ainsi la survie des souris traitées après une xénogreffe de cellules de myélomes multiples (72).

4.2.2. Les polyplexes

La seconde catégorie de vecteurs non-viraux est celle des polymères, molécules de fortes masses moléculaires caractérisées par la répétition d'un ou plusieurs monomères chargés positivement. Ils peuvent incorporer des substances actives aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes. Leur fort caractère cationique leur confère une capacité d'encapsulation des acides nucléiques importante pour former des polyplexes. On peut aisément les séparer en deux groupes : les polymères synthétiques et les polymères naturels dont voici les représentants les plus étudiés (Figure 1.6) :

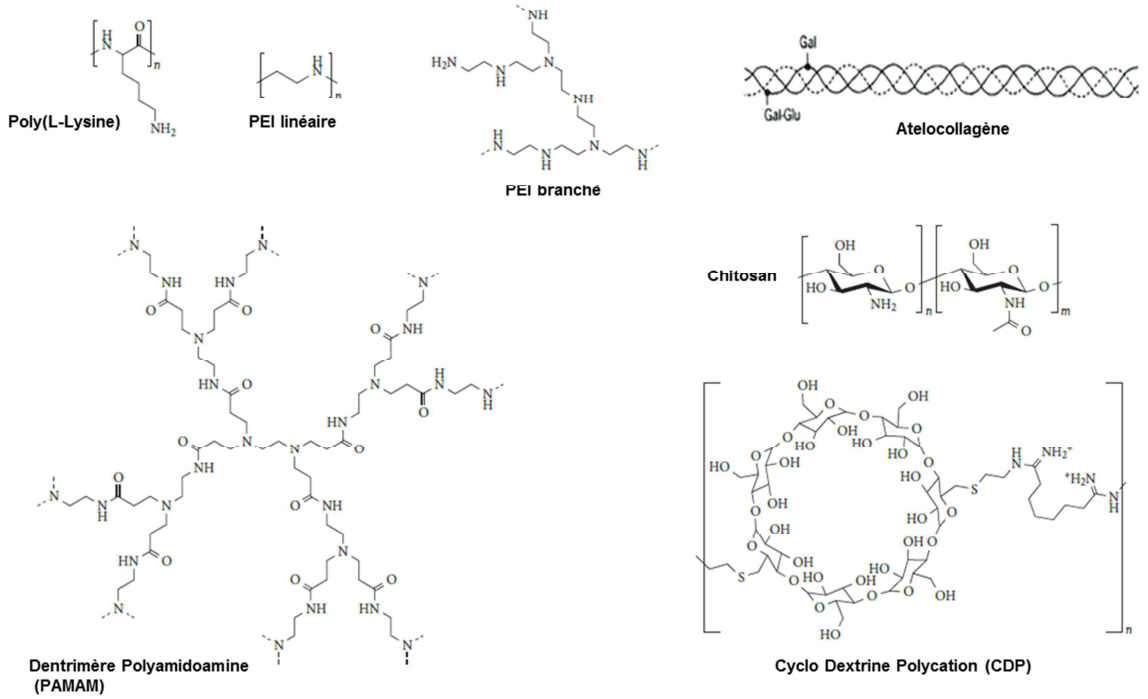


Figure 1.6 : Structures chimiques de vecteurs polymériques communément utilisés pour la délivrance de gènes. Poly(L-lysine) (PLL), polyethylenimine (PEI) linéaire et branché, le dendrimère polyamidoamine (PAMAM) pour les polymères synthétiques. L'atelocollagène, le chitosan et la cyclodextrine polycation (CDP) pour les polymères naturels. Adaptée de (14)**.**

La poly(L-lysine) (PLL) et la polyéthylènimine (PEI) ont été les premiers polymères synthétiques étudiés, il existe d'ailleurs des versions commerciales du PEI, le ExGen500 (73) et le jet-PEI® (PolyPlus transfection) (74). Le PEI est un polymère de groupements amines séparés par 2 atomes de carbones (-CH_2-CH_2-). Les vecteurs à base de PEI sont d'une grande efficacité *in vitro* et *in vivo* (75). A pH physiologique, les vecteurs de PEI portent une densité importante de charge provenant des 20% de groupements amines protonables (75). Ces charges leur confèrent la capacité de condenser le siRNA à de très petites tailles, de déstabiliser la membrane tout en conservant leur effet tampon (éponge à proton) crucial pour la libération des endosomes (76). Cependant cette importante densité de charge est responsable en contrepartie d'une cytotoxicité et de phénomènes d'agrégation dépendants de la charge de surface et de la force ionique. Le PEI existe sous forme linéaire mais aussi sous forme branchée ce qui permet d'augmenter sa charge cationique en modulant les proportions de groupements amines. Le PEI linéaire est moins cytotoxique mais présente une condensation et une capacité à s'échapper des endosomes amoindries (77). Quant aux PLLs, ils sont biodégradables de par leur nature peptidique cependant ils présentent des efficacités de transfection moins importants que les PEI (78). En effet, leur faible taux de groupements amines protonables réduit la libération des endosomes et donc l'expression du gène transfectée. Les PLLs ont ensuite été amélioré pour augmenter leur capacité à s'échapper des endosomes par exemple à l'aide d'inclusion de résidu histidine. Ces modifications ont permis d'augmenter de manière significative l'expression de gènes (79,80)

Les dendrimères font partie d'une catégorie spécifique de polymères synthétiques, en effet ils ont une structure tridimensionnelle en arborescence. Le dendrimère polyamidoamine (PAMAM) a été l'un des premiers utilisés pour la délivrance d'acide nucléique *in vitro* et *in vivo* (81). Il est constitué d'un squelette hydrogénocarboné organisé en générations successives : la taille, le nombre de groupements fonctionnels et la densité de charge en surface augmentent avec le nombre de génération. Le siRNA s'associe de préférence aux amines de surface tandis que les amines protonées du cœur de la structure vont contribuer à l'effet proton nécessaire à la sortie des endosomes (82). Ainsi les polyplexes de PAMAM protègent le siRNA

d'une dégradation enzymatique tout en assurant une transfection efficace. Il a été démontré sur des cellules en culture que la transfection à l'aide de PAMAM entraîne une inhibition de l'expression de la protéine cible d'autant plus importante que l'on augmente le nombre de générations contenant plus de groupements amines (83).

Les polymères naturels (atelocollagène et chitosan) sont souvent issus du vivant ce qui assure leur biocompatibilité. Cette biocompatibilité leur permet d'être des vecteurs sûrs en thérapie génique, ils sont biodégradables et n'induisent pas de forte réponse immunitaire. L'atelocollagène provient du collagène de type I issu de derme de veau. Il est obtenu après un traitement à la pepsine et une étape de purification qui consiste à léser la protéine sur les parties N- et C-terminales de télopeptides (petites protéines libérées lors de la dégradation du collagène osseux) reconnus comme immunogènes (84). Initialement développé pour la délivrance de protéines (84), il a rapidement montré un potentiel intéressant pour la délivrance d'acide nucléique. En effet l'atelocollagène est chargé positivement, il est riche en lysine et en hydroxylysine donc parfaitement adapté pour interagir avec le siRNA. Le système atelocollagène/siRNA montre une efficacité intéressante en administration intratumorale qu'en systémique sur des modèles de tumeurs classiques ou métastatiques (85).

Le Chitosan est l'un des vecteurs polymériques naturels les plus étudiés (86). C'est un polysaccharide composé d'unité N-acétyl-D-glucosamines et D-glucosamines. Il est dérivé de la chitine, dédié au départ à la délivrance de protéines puis d'ADN puis enfin de siRNA (87). L'interaction électrostatique avec le siRNA est due à la protonation de la sous unité D-glucosamine sur une amine primaire pour le chitosan natif ou d'amine secondaire ou tertiaire pour des chitosans modifiés. Dans les traitements contre le cancer, le chitosan est reconnu pour ses propriétés anticancéreuses intrinsèques (88) mais aussi pour son efficacité de vectorisation du siRNA sous la forme de nanoparticules ou associé en surface à d'autres nanoparticules polymériques (polyisohexyl/butylcyanoacrylate) pour des applications par voie intratumorale ou systémique (85).

Actuellement, des structures nettement plus complexes mimant les vecteurs viraux, les lipopolyplexes, ont fait leur preuve dans l'amélioration de l'efficacité de transfection de siRNA *in vitro* et *in vivo* sur des carcinomes de poumon par exemple

(89). Ils sont constitués d'une nanoparticule polymérique condensant l'acide nucléique (représentative de la capside virale) surmonté par une bicouche lipidique contenant des motifs de ciblage.

4.2.3. Les Nanoparticules métalliques

D'autres stratégies impliquent des nanoparticules à cœur métallique de cobalt, fer, or ou nickel. Ces particules sont enrobées d'une couche de thiols, de sucres ou de polymères à laquelle est conjugué ou adsorbé le siRNA pour former une structure cœur/coque. Un bon nombre de ces vecteurs ont montré une efficacité de transfection excellente comme les nanoparticules d'or (90) et d'autres affichent un intérêt supplémentaire provenant de leurs propriétés physiques, ils peuvent être fluorescents, magnétiques photosensibles ou thermosensibles etc. (91) L'activation de leur propriété physique permet une activité diagnostique et/ou thérapeutique. De plus ces nanoparticules sont fonctionnalisables en surface pour du ciblage (92). L'inconvénient de ces systèmes est qu'ils ne sont pas biocompatibles ni dégradables ce qui explique leur toxicité relative et le fait que leur application reste encore limitée (5,93).

5. Peptides vecteurs ou « *cell penetrating peptides* »

Il y a vingt ans, la notion de « peptide internalisant » a été proposée suite à l'observation de quelques protéines, surtout des facteurs de transcription, qui pouvaient circuler de cellule en cellule. Historiquement, les premières observations ont été réalisées par Frankel et Pabo (94) et par Green et Loewenstein (95) en 1988. Ils ont démontré que la protéine Tat issue du virus de l'immunodéficience humaine 1 (HIV-1) pouvait pénétrer les cellules et se localiser dans le noyau. En 1991, le groupe du Pr. Prochiantz démontre que l'homéodomaine de la protéine *Antennapedia* de la drosophile peut être internalisé dans des neurones (96).

5.1. Définition des CPPs

Les peptides vecteurs ont connu un véritable essor durant ces dernières années. Ils sont plus communément appelés « *cell penetrating peptides* » ou CPPs, terme mentionné pour la première fois par Langel et coll. en 1998 (97).

Il n'existe pas de définition précise des CPPs. Cependant, ils possèdent les caractéristiques communes suivantes : i) séquence peptidique entre 10 et 30 résidus, ii) charge nette positive et iii) capacité à traverser la membrane plasmique seul ou avec une molécule d'intérêt. Ils peuvent délivrer cette molécule soit dans le cytoplasme soit dans le noyau. La catégorie des CPPs est composée d'un grand nombre de peptides différents dérivant de toxines antimicrobiennes, de protéines virales, de domaines de translocation de protéines (PTD), d'hormones ou de polypeptides cationiques (98).

Sous cette définition générique se trouve plus d'une centaine de peptides décrits dans la littérature capables de transporter une multitude de molécules différentes telles que des protéines, des peptides, des acides nucléiques (ADN, ARN, PNA, etc.) mais également des petites molécules thérapeutiques chimiques, des sondes fluorescentes, etc. (99). En général, les molécules à transporter dites cargaisons peuvent être couplées de manière covalente au CPP ou bien être transportées via la formation d'un complexe non covalent CPPs/cargo (voir § 5.3). Cependant, le mécanisme de translocation de la plupart des CPPs est à ce jour encore très mal connu. Même si d'énormes progrès ont été faits dans le domaine, le mécanisme d'internalisation est un processus multifactoriel pour lequel la combinaison de plusieurs techniques est nécessaire pour tenter de le mettre en évidence (voir § 5.4).

La plupart des peptides vecteurs montrent une grande efficacité d'internalisation tout en étant peu toxique grâce à leur nature peptidique permettant leur dégradation par les mécanismes naturels de la cellule (100).

5.2. Classification des CPPs

Du fait que les CPPs ont une grande variété de séquence, il est difficile d'établir une relation directe entre la séquence des peptides et leur capacité d'internalisation ce qui rend leur classement assez complexe.

Une première classification basée sur leurs origines permet de les classer en fonction de leur mode de conception (voir § 5.2.1). Cependant une meilleure compréhension des mécanismes d'internalisation a permis de mettre en avant des caractéristiques physico-chimiques importantes (mais non universelles) pour l'internalisation des CPPs, ce qui a abouti à l'apparition d'une nouvelle classification (voir § 5.2.2).

5.2.1 Classification des CPPs en fonction de leur origine

Les CPPs présentés dans ce paragraphe sont classés en trois groupes : le groupe des peptides dérivant de domaine de transduction de protéines (ou PTD *protein transduction domains)*, le groupe des peptides chimériques et le groupe contenant les peptides synthétiques (Tableau 1.1).

Les peptides dérivant de protéines :

Un grand nombre de CPPs ont été conçus à partir de séquences protéiques dérivant de protéines capables d'interagir avec les membranes comme les protéines de fusion, les peptides signaux, les domaines transmembranaires et les peptides antimicrobiens. Parmi ces séquences, les PTDs montrent une grande efficacité à traverser les membranes biologiques indépendamment de transporteurs ou de récepteurs spécifiques ainsi que l'aptitude à délivrer des peptides ou des protéines à l'intérieur de la cellule (101,102).

Les deux premiers CPPs découverts et les plus utilisés à ce jour sont la pénétratine (103) et le Tat(48-60) (104) .

La **pénétratine** est un peptide vecteur dérivant de l'homéodomaine de l'homéoprotéine *Antennapedia*-(43-58) de drosophile. Ce facteur de transcription interagit avec l'ADN via les 60 acides aminés conservés de l'homéodomaine (105).

Ces homéoprotéines sont habituellement constituées de 3 hélices caractérisées par un arrangement hélice-tour-hélice (105). Des mutations sur chacune des hélices ont mis en évidence que la 3ème hélice était responsable de la translocation à l'intérieur des cellules neuronales (103). Ce fragment long de 16 acides aminés, *Antennapedia*(43-58), fût appelé par la suite pénétratine.

Trois résultats particulièrement importants ont été obtenus :

- Le premier indique le rôle du résidu tryptophane 48 (W^{48}) qui ne peut être remplacé par aucun autre acide aminé hydrophobe sans diminution considérable de l'internalisation de l'homéodomaine (106).

- Le second résultat montre qu'il n'y a pas de récepteur chiral qui assure l'entrée cellulaire du peptide dans la mesure où le peptide en série dextrogyre entre d'une manière aussi efficace dans les cellules (107).

- Le troisième révèle l'importance de la structure en hélice alpha pour l'internalisation. Une mutation (Q^{50}→P) déstabilise la structure en hélice et diminue dramatiquement l'efficacité d'entrée cellulaire de la pénétratine (103,108).

En 1997, Vivès et ses collègues ont mis en évidence la séquence peptidique minimale de la protéine trans-activatrice de la transcription (TAT) du virus de l'immunodéficience humain (HIV-1) responsable de l'internalisation. Les études de structure-activité sur la protéine TAT ont indiqué qu'un fragment d'environ 12 acides aminés, fragment 48-60, est responsable de l'internalisation de la protéine (104), ces résultats ont été confirmés par la suite par d'autres groupes (109,110). Les premières études ont montré que le peptide **Tat(48-60)** s'accumule donc dans la cellule au niveau du cytosol et du noyau d'une manière dose-dépendante (104). Enfin, un peptide contenant la séquence basique entière [**Tat(48-57**)] montre les mêmes résultats que ceux obtenus avec Tat(48-60), confirmant ainsi que les trois résidus côté C-terminal (PPQ) n'ont pas d'influence (111). Wender et coll. montrent également que les séquences de Tat en série D et rétro-inverso sont aussi efficacement internalisées que la séquence native (112). La chiralité n'a pas d'influence dans le mécanisme d'internalisation. Depuis ces études, de nombreux groupes de recherche ont utilisé cette séquence de 47 à 57 du peptide Tat

(YGRKKRRQRRR) afin d'augmenter la délivrance intracellulaire de différentes cargaisons.

Le peptide nommé **pVEC** provient de la région transmembranaire proche du cytoplasme (résidus 615 à 632) de la protéine cadhérine de cellules vasculaires endothéliales murines (VE-cadhérine) (113). La VE-cadhérine joue un rôle actif dans le transfert de signaux à l'extérieur de la cellule et dans le contrôle de la perméabilité vasculaire et de l'angiogenèse. Les quatre résidus d'arginine et les deux de lysine dans la séquence primaire donnent une charge fortement positive à pVEC lorsqu'il est dilué dans un tampon physiologique. Le peptide pVEC peut internaliser des PNAs (*peptide nucleic acid*), des protéines et des molécules fluorescentes. pVEC a été utilisé comme agent de transfection dans différents domaines par exemple celui des algues (114), des plantes (115) mais aussi en tant que peptide antibactérien (116).

Tableau 1.1 : Exemple de CPPs classés par l'origine de leur séquence.

Noms	Séquences	Nb	Référence
Peptides dérivés de protéines			
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	16	Derossi et al. 1994
Tat(48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	13	Fawell et al. 1994
hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	24	Schmidt et al. 1998
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAHSK	18	Elmquist et al. 2001
Peptides chimériques			
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	27	Pooga et al. 1998
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	27	Morris et al. 1997
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	21	Morris et al. 2001
CADY	GLWRALWRLLRSLWRLLWKA –Cya	20	Crombez et al 2009
Peptides synthétiques			
Arg9	RRRRRRRRR	9	Wender et al. 2000
MAP	KLALKLALKALKAALKLA	18	Oehlke et al. 1998

Notes : Nb, nombre de résidus de la séquence

Certains peptides sont dérivés de protéines humaines tel que le peptide vecteur dérivé de la calcitonine humaine **hCT(9-32)** (117). La calcitonine humaine est une hormone secrétée par les cellules C de la glande thyroïde qui est impliquée dans l'homéostasie calcique. La calcitonine humaine est capable de traverser l'épithélium nasal et des études de relations structure/activité ont montré que le fragment à l'extrémité C-terminale de la protéine, le fragment 9-32, est responsable de ce phénomène (118).

L'hCT(9-32) a été utilisée pour transférer plusieurs molécules comme la daunorubicine (drogue antiproliférative) (119), de l'ADN ou de l'ARN (120), ainsi que de grandes molécules comme la protéine GFP (121). L'étude du mécanisme d'internalisation de l'hCT(9-32) a montré que l'entrée dans les cellules dépend de la température, du temps d'incubation et de la concentration, ce qui suggère un mécanisme endosomal (122).

Les peptides chimériques

Les CPPs chimériques sont des peptides dont la conception est basée sur la fusion entre des petits fragments de protéines naturelles. Dans ce chapitre, le transportan sera présenté plus en détail tandis que celle des CPPs MPG, Pep-1 et CADY feront l'objet du paragraphe 6.1 de cette introduction.

Le **transportan** est né de l'association entre les 12 résidus N-terminaux d'un neuropeptide, la galanine, connecté par une lysine avec un peptide de 14 résidus extrait du venin de frelon, le mastoparan (97). Le transportan est capable de traverser la membrane plasmique mais aussi de se localiser dans la région périnucléaire (97). Le transportan a été utilisé pour transférer un grand nombre de macromolécules. Il a été utilisé par exemple pour le transfert de protéines *in vitro* (123), pour le transfert de PNA *in vitro* ou *in vivo* (97) et pour le transfert de siRNA (124).

En ce qui concerne l'état structural du transportan, la plupart des études réalisées ont montré l'existence d'une structure hélicoïdale en présence de lipides ou de SDS (125).

Afin de déterminer la séquence responsable de l'internalisation du transportan, neuf analogues (TP7 à TP15) ont été synthétisés et seul le transportan 10 (TP10 – 21mer) est aujourd'hui retenu comme CPP efficace en terme d'internalisation cellulaire issu de cette analyse de relations structure/activité (126). Plus récemment, TP10 fût la base pour le développement de la famille des PepFects (127) et des NickFects (128) qui ont montré leur efficacité pour le transfert de différent oligonucléotides *in vitro* et *in vivo* en stratégie non covalente (pour plus de détails voir le §5.3.2).

Les peptides synthétiques :

Les CPPs synthétiques sont issus de travaux essayant de rationaliser le mécanisme d'internalisation et de comparer les séquences primaires (homologie) ainsi que de travaux de criblage de banques peptidiques.

Les candidats les plus décrits sont les homopolymères d'arginines, plus communément appelés **polyarginines,** conçus par analogie avec la séquence

peptidique de Tat possédant déjà six arginines. Ces polymères ont montré une efficacité de translocation supérieure en comparaison avec des homopolymères composés d'ornithine, de lysine ou d'histidine (129). Deux peptides ont alors été régulièrement utilisés et décrit dans la littérature : l'heptamère R7 et le nonamère R9 (130–132).

Les polyarginines ont permis de transfecter plusieurs peptides *in vitro* et quelques protéines *in vivo* (133,134). Le peptide Arg7 a notamment été utilisé pour transférer la cyclosporine A (135) et le peptide Arg9 pour transférer une catalase humaine *in vivo* (136). Si la plupart des utilisations s'effectuent par formation de conjugués covalents entre les peptides et les molécules à transférer, les polyarginines ont été également greffés par des chaines grasses du type stéaryle pour le transfert de plasmide via la formation d'un complexe (137).

Le peptide **MAP** (pour « *model amphipathic peptide* ») est un CPP synthétique développé pour former une hélice amphipathique. En 1996, Oehlke et ses collègues décrivent dans une analyse de relations structure/activité que seul le peptide MAP montre une accumulation intracellulaire, tandis qu'un analogue non amphipathique présente une absence d'internalisation dans les cellules (138). Les MAPs ont montré une grande efficacité dans le transfert de peptides chargés liés de manière covalente par un pont disulfure (139). Puis une série de plusieurs peptides amphipathiques de 18 résidus différents les uns des autres par leurs séquences primaires, leurs charges, leur hélicité ou leur balance hydrophobie/hydrophilie ont été comparés. Il est ressorti de cette étude que le caractère amphipathique est le seul critère structural essentiel pour la translocation des MAPs (140). Les peptides MAPs permettent d'augmenter l'internalisation de PNAs (141), de délivrer des petites protéines comme le Cytochrome C (142) ou du siRNA (143).

5.2.2 Classification des CPPs en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques

Même si les CPPs montrent une grande divergence dans leurs séquences primaires, il est possible d'identifier trois classes majeures selon leurs propriétés physico-

chimiques : les peptides cationiques, amphipathiques et hydrophobes (144). Le Dr. Milletti a regroupé plus de 100 CPPs différents collectés de la littérature ou de brevets. La plupart de ces peptides ont une charge positive (83%). Le groupe des CPPs amphipathiques qui comprend des peptides cationiques et anioniques forme la deuxième classe (44%) suivi par les peptides hydrophobes (15%) (Figure 1.6).

Les peptides cationiques

Les CPPs cationiques sont des peptides dont la majorité des résidus chargés sont positifs mais ne présentent pas de caractères amphipathiques. Les CPPs comme Tat (104), la famille des poly-arginines ainsi que les poly-lysines (145), sont les vecteurs les plus connus qu'on peut citer ici. Des études ont montré que huit charges positives étaient nécessaires pour l'internalisation de ces CPPs cationiques (146). Cependant, à part les charges positives, d'autres résidus sont cruciaux pour l'internalisation, comme le tryptophane de la pénétratine (147).

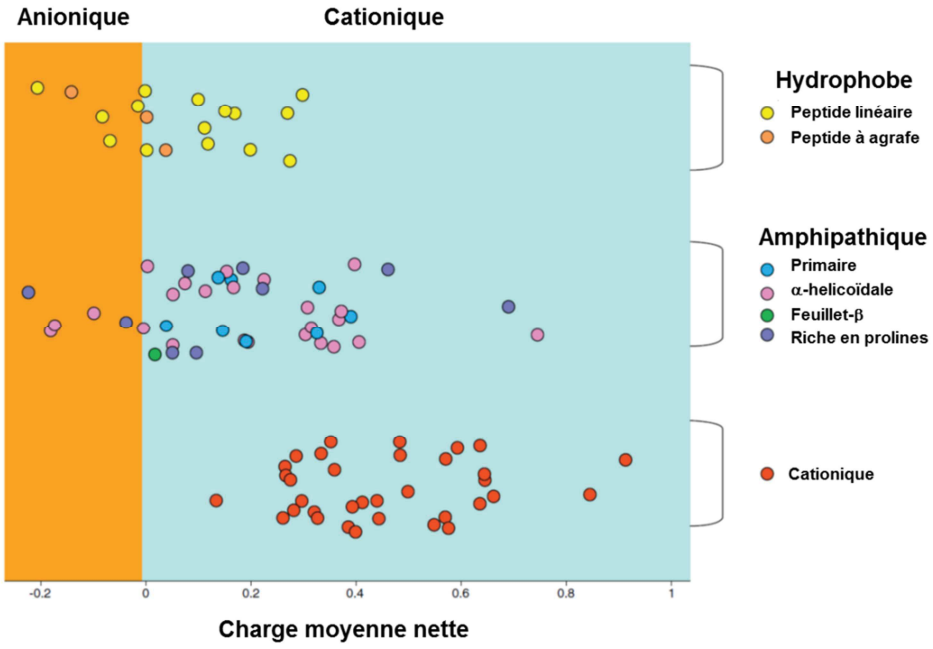


Figure 1.6 : Distribution des CPPs selon leur charge nette et leur classe. Les CPPs anioniques peuvent être inclus dans la classe des CPPs hydrophobes ou amphipatiques, contrairement aux CPPs cationiques qui peuvent avoir un caractère ni hydrophobe ni amphipathique.

Les peptides amphipathiques

Les peptides amphipathiques contiennent une zone de résidus hydrophobes et une zone de résidus hydrophiles dans leur séquence. Ils sont dit primaires lorsque la séparation des deux blocs se fait tout au long de la séquence en acides aminés (structure primaire) et secondaire si le peptide est capable d'adopter une conformation (structure secondaire) permettant la séparation entre les deux types de résidus (pour plus de détails cf. § 6 de ce chapitre et Figure 1.10).

Plusieurs CPPs amphipatiques primaires sont des peptides chimères obtenus par liaison covalente entre le fragment hydrophobe d'un domaine protéique qui cible efficacement la membrane plasmique et une séquence de localisation nucléaire ou NLS (pour « *nucleus localisation sequence* ») comme par exemple MPG et Pep-1 (148,149). D'autres CPPs amphipatiques primaires sont dérivés de protéines, comme pVEC (113), ARF(1-22) (150) ou BPrPr(1-28) (151).

Voici quelques exemples de CPPs amphipatiques secondaires dans lesquelles les acides aminés hydrophiles et hydrophobes sont regroupés de part et d'autre d'une structure hélicoïdale (Figure 1.7). On peut observer cette caractéristique pour les CPPs MAP (139), CADY (152,153), PreS2-TLM (154) ainsi que SG3 (155).

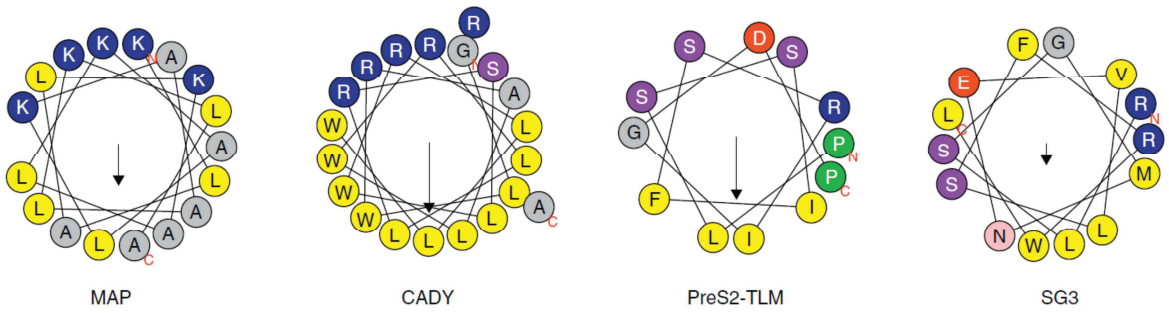


Figure 1.7 : Schéma de différents peptides amphipatiques secondaires par la représentation « H*elical Wheel* ».Code couleur de la nature des résidus : jaune: hydrophobe; gris : apolaire; violet: polaire; bleu: chargé positivement; rouge : chargé négativement; vert: proline. Figure issue de (144).

Il existe une classe particulière de peptides amphipathiques secondaires riches en proline. Ces peptides forment une hélice gauche de type polyproline II avec 3 résidus

par tour au lieu de 3,6 avec une hélice alpha classique (144). Les plus décrits sont le CPP SAP, basé sur la séquence $(VRLPPP)_3$ et issu de la protéine naturelle γ-zein (156,157), la bactenin-7 (158), les peptides synthétiques basés sur les motifs de répétitions $(PRR)_n$ ou $(PPR)_n$ avec n= 3, 4, 5, 6 (159) et les peptides amphipathiques riche en arginine formant une hélice du type polyproline II (160).

Même si la plupart des CPPs amphipatiques sont cationiques, on peut penser que la translocation membranaire de ces peptides est une conséquence de l'amphipaticité et non de la présence de charges positives dans la séquence puisqu'il existe aujourd'hui plusieurs CPPs amphipathiques secondaires anioniques tels que MAP17 (140), MAP12 (161), GALA (162) , p28 (163) et aussi SAP(E) (164).

Les peptides hydrophobes

Les CPPs hydrophobes sont classifiés par une charge positive minimale (moins de 20% de la séquence) ou par un motif/groupement chimique hydrophobe indispensable pour l'internalisation cellulaire (144). La famille des CPPs hydrophobes compte seulement quelques membres, comme Pept1 et Pept2 (165) ainsi que IVV-14 (166). Parmi eux, on compte aussi les peptides à agrafe (*stapled*) (167), les peptides prénylés (168) et les pepducins (169).

5.3. Stratégie de délivrance

Les peptides vecteurs sont des outils pertinents qui permettent l'amélioration du rendement d'internalisation de leurs cargaisons dans les cellules. Comme évoqué précédemment, l'internalisation de la cargaison peut se faire *via* une stratégie de délivrance covalente (liaison chimique avec la cargaison) ou non covalente (formation de nanoparticule peptidique avec la cargaison) (Figure 1.8).

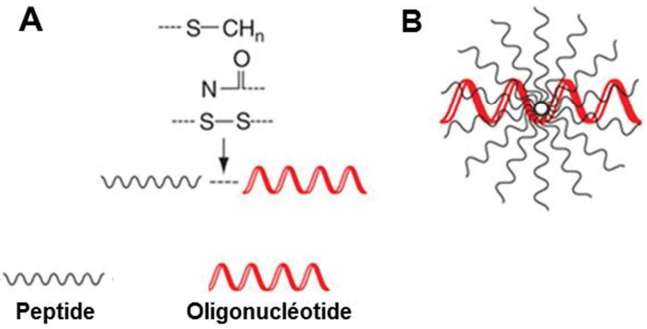


Figure 1.8: Schéma récapitulatif des deux principales stratégies de délivrance. **(A)** Conjugaison covalente entre le peptide vecteur et l'oligonucléotide par une liaison stable ou par un lien clivable. **(B)** Formation d'un complexe entre le peptide vecteur et l'oligonucléotide par des interactions électrostatistiques et/ou hydrophobes. Figure adaptée de (170).

5.3.1. Stratégie covalente

La formation d'une liaison covalente entre la cargaison et le transporteur peut se réaliser à travers diverses réactions chimiques comme par exemple la formation d'un pont disulfure, d'une liaison amide, thioéther ou thioester (Figure 1.8 (A)). L'expression d'une protéine de fusion-CPP est également possible. La plupart des travaux reportés concernent les peptides Tat, pénétratine, transportan et polyarginines ainsi que des CPPs de nouvelle génération combinant différents domaines de CPP. Comme par exemple R_nPen (avec n = 3, 6 ou 9) qui résulte de l'association par une liaison covalente de polyarginines de tailles différentes avec la pénétratine (171).

Cette stratégie a permis une délivrance efficace de molécules plutôt neutres comme des PNAs (172), des phosphorodiamidate morpholino-oligomères (PMO) (173) ainsi que des peptides et protéines (174). La stratégie covalente permet aussi de coupler les CPPs avec des structures plus imposantes comme les lipoplexes (§ 4.2.1) ou les polyplexes (§ 4.2.2) précédemment présentées et d'en améliorer les capacités de transfection (99).

L'avantage de cette stratégie covalente est de pouvoir contrôler la stœchiométrie entre le CPP et la cargaison mais cette méthode nécessite dans certains cas une modification chimique de la cargaison et/ou du CPP afin de réaliser le couplage.

5.3.2. Stratégie non covalente

Le vecteur et la cargaison forment un complexe stable au travers d'interactions électrostatiques et hydrophobes (Figure 1.8 (B)). Cette stratégie a été originellement conçue pour la délivrance d'acides nucléiques avec MPG (148,175), puis étendue à d'autres types de cargaison comme les peptides ou les protéines avec l'utilisation de Pep-1 (176). Elle a ensuite été appliquée à d'autres CPPs comme à Tat (177), aux polyarginines (178), à CADY (152), aux peptides dérivés du transportan (179,180) ainsi qu'à la famille PepFect (181). De la même manière que d'autres types de vecteurs (lipides ou polymère cationiques), les CPPs cationiques sont particulièrement adaptés pour associer les acides nucléiques au travers d'interactions électrostatiques. Ils forment un système nanoparticulaire dont la stœchiométrie idéale est importante à définir pour des propriétés de transfection optimale. Par contre, pour une cargaison neutre (peptide ou protéine neutre, agent chimiothérapeutique, etc.) ou cationique, il est difficile d'appliquer cette stratégie. Le couplage à travers une liaison covalente est alors requis.

5.4 Mécanisme d'internalisation

5.4.1. L'internalisation par voie d'endocytose

L'association initiale des peptides internalisant avec la membrane plasmique repose sur des interactions multivalentes avec des protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG pour *heparan sulfate proteoglycan*) présents à la surface cellulaire. Toutefois, il est clairement admis que l'endocytose joue un rôle majeur (182). Les peptides utiliseraient les trois voies endocytotiques simultanément (dépendante de la clathrine, macropinocytose et radeaux lipidiques/cavéoline), ce qui est corrélé avec le

manque d'inhibition complète de l'internalisation lorsque l'on applique des composés sélectifs de chacune de ces voies d'internalisation (183). Généralement, l'implication de ces différentes voies est déterminée en utilisant des inhibiteurs spécifiques à chacune d'elles cependant certains auteurs suggèrent que l'inhibition d'une voie d'endocytose peut inciter le CPP à s'internaliser par une autre. Voici quelques exemples illustrant les différentes voies d'internalisation des mêmes CPPs selon les modèles biologiques utilisés :

- La plupart des peptides riches en arginines, polyarginines, Tat mais aussi la pénétratine sont capables d'entrer dans la cellule en suivant un mécanisme de macropinocytose (184–186).
- Tat, la pénétratine, pVEC et le transportan sont internalisés dans les cellules après inhibition de la voie clathrine-dépendante dans des cellules en se plaçant dans des conditions d'hyperosmolarité (187). Cependant des études contradictoires ont montré que l'internalisation de Tat n'était pas affectée en présence d'inhibiteur de la voie clathrine (184) ni même après transfection de cellules modifiées pour ne plus produire la clathrine (188).
- Le mécanisme de certains CPPs comme Tat, pénétratine, transportan et sa version tronquée TP10 sont liés à des phénomènes d'endocytose impliquant les radeaux lipidiques (189), domaines liés aux cavéoles. Ce processus d'endocytose peut être indépendant (188,189) ou dépendant de la cavéoline (123).
- Il a aussi été montré que R9, Tat et la pénétratine pouvaient aussi entrer dans la cellule en utilisant simultanément les 3 voies d'endocytoses cités précédemment (182).

L'inconvénient majeur du passage par les voies d'endocytose est la dégradation du CPP et de sa cargaison dans les endosomes dont le pH est acide. Ce phénomène influe directement sur la réponse biologique attendue. Dans ce contexte, les chercheurs ont optimisé et développé des CPPs capables de s'échapper des endosomes et de restaurer l'efficacité de transfection (190–192).

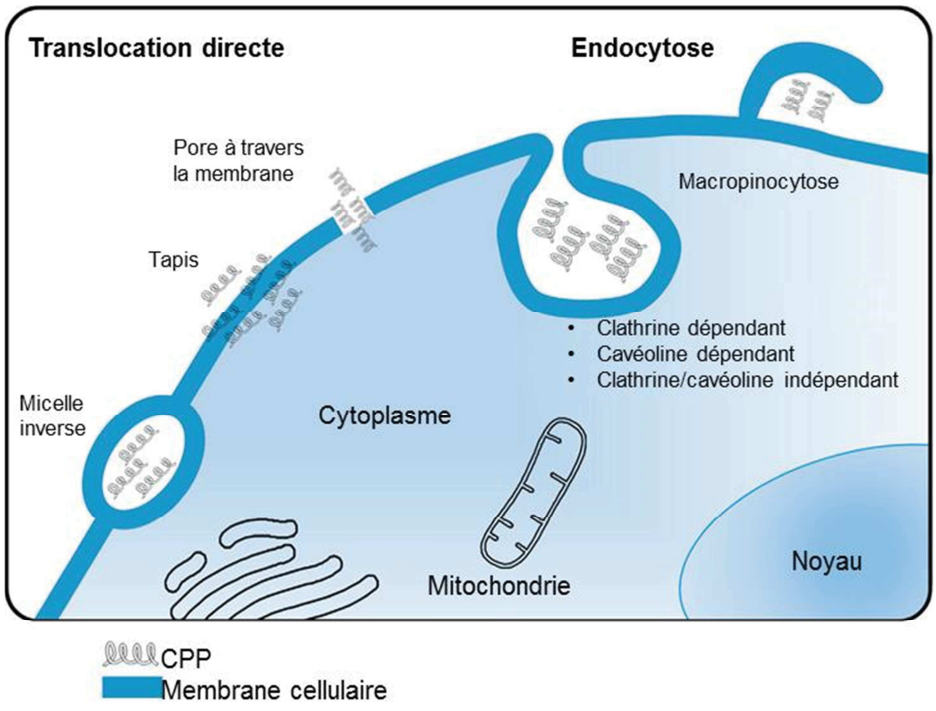


Figure 1.9 : Schéma des divers mécanismes d'internalisation utilisés par les CPPs. Figure adaptée de (186).

Le mécanisme mis en jeu pendant l'internalisation peut dépendre de la cargaison attachée au CPP avec une préférence à l'endocytose pour les macromolécules (123) mais aussi dépendant de la concentration en peptide. De faibles concentrations impliquent un mécanisme d'endocytose tandis que de fortes concentrations impliquent plutôt une internalisation directe (182). De plus, bien que les analyses présentées ci-dessus montrent que l'endocytose est largement impliquée dans l'internalisation des CPPs, il semble que plusieurs mécanismes puissent intervenir simultanément. L'idée d'une internalisation *via* différents mécanismes est renforcée par les études réalisées sur la pénétratine et le transportan qui mentionnent l'intervention des deux processus d'entrée, l'endocytose et la translocation directe (187,193).

5.4.2. L'internalisation par translocation directe

La translocation directe des CPPs se décline en plusieurs processus dont les principaux sont la micelle inverse, le modèle tapis ou « *carpet model*» ou la formation de pores (Figure 1.9). Le mécanisme de translocation directe est principalement validé en évaluant les interactions CPPs/lipides par des méthodes biophysiques et en utilisant des inhibiteurs des voies d'endocytose pour exclure cette possibilité de mécanisme. La translocation directe à l'avantage de délivrer le CPP et sa cargaison directement dans le cytoplasme.

Le mécanisme de micelle inverse a été décrit pour la première fois pour la pénétratine (108). La présence du CPP entraîne une perturbation de la bicouche lipidique associée à un changement du rayon de courbure, ce processus conduit à une invagination de la membrane puis à la formation d'une micelle encapsulant le CPP (Figure 1.9). Ce mécanisme de translocation directe est qualifié « d'endocytose physique ». La micelle inverse a ensuite été décrit pour des CPPs riches en arginines tels que R12 (194), R9 et Tat (195,196).
Le modèle tapis nécessite une accumulation du peptide vecteur à la membrane, au-delà d'une concentration seuil le CPP désorganise la structure lipidique pour permettre son passage à travers la membrane (197,198). La pénétratine (199), RW9 (200) et R9 (201) ont été décrit comme ayant la capacité de perturber et de fluidifier des modèles bicouches lipidiques supposant que leur internalisation puisse se réaliser selon le modèle tapis (198).

La formation de pore passe par une première étape d'interaction du peptide avec les phospholipides. Puis dans un second temps les peptides s'associent entre eux dans une conformation transmembranaire formant une structure cylindrique à travers la membrane. Ce mécanisme entraine la formation de pores en général transitoire comme reporté pour les peptides amphipathiques MPG et Pep-1 (149,202). La translocation par formation de pore a également été proposée pour Tat à partir d'une analyse en modélisation moléculaire (203). Cette simulation suppose que Tat adopte une conformation hélicoïdale ce qui n'a cependant pas été prouvé par d'autres techniques (204).

Pour tous ces modèles de translocation, l'étape essentielle consiste en une interaction forte entre le CPP et les phospholipides modulée par la présence de résidus chargés tel que l'arginine mais aussi de résidus hydrophobes comme le tryptophane ainsi qu'un caractère amphipathique (100,185,198). Le mécanisme de translocation directe promue par de fortes interactions avec les lipides et leur réorganisation au sein de la bicouche modèle soulève le problème de la toxicité pour la cellule. Cependant, il a été reporté par le Dr Palm-Apergi que la membrane plasmique avait la capacité de restaurer son intégrité suite à une perturbation induite par l'internalisation de CPP. Un efflux de calcium à travers les défauts crées dans la bicouche lipidique enclenche le processus de réparation de la membrane (*membrane repair response*) (205).

5.4.3. L'internalisation récepteur-dépendante

Malgré l'hypothèse d'un mécanisme indépendant de récepteurs de nombreuses études soulignent la capacité des CPPs à interagir de manière non spécifique avec des éléments de la matrice extracellulaire, les glycoaminoglycanes (GAGs). Ces polysaccharides sont chargés négativement permettant une forte interaction électrostatique avec les CPPs cationiques. Ces interactions peuvent alors servir d'amorce pour le processus d'internalisation qu'il soit par endocytose (206–208) ou translocation directe (209,210).

Lehtoha et coll. ont montré que l'isoforme universellement exprimé de la famille des protéoglycanes syndécan transmembranaires (syndécan-4) sert de médiateur pour le transport de la pénétratine, R8 et Tat dans les cellules (211). Des études quantitatives d'internalisation et des analyses mutationnelles montrent que la fixation des CPPs cationiques est médiée par des interactions spécifiques entre les chaînes de sulfate d'héparane de syndécan-4 et le CPP. Ces premières données recueillies prouvant la possibilité d'une implication de récepteurs au cours de l'internalisation des CPPs ont été mises en évidence par d'autres auteurs. Le récepteur de la chimiokine CXC de type 4 pour les poly-Arginines (R12) (212) et les récepteurs de type scavenger (SCARA) pour le PepFect14 (213) sont d'autres exemples d'une internalisation des CPPs récepteur-dépendante.

6. Peptides amphipatiques

Une molécule amphipathique peut être définie brièvement comme étant constituée de deux domaines : un domaine hydrophile (polaire) et un domaine hydrophobe (apolaire). En ce qui concerne les peptides, le caractère amphipathique peut être présent soit dans la structure primaire soit dans la structure secondaire. Les peptides amphipathiques primaires sont constitués d'un domaine composé de résidus hydrophobes et d'un domaine composé de résidus hydrophiles (Figure 1.10 (A)). Dans le cas des peptides amphipathiques secondaires, l'état conformationnel conduit à la répartition de tous les acides aminés hydrophiles d'un côté et tous les acides aminés hydrophobes de l'autre côté de la structure tridimensionnelle du peptide (Figure 1.10 (B)).

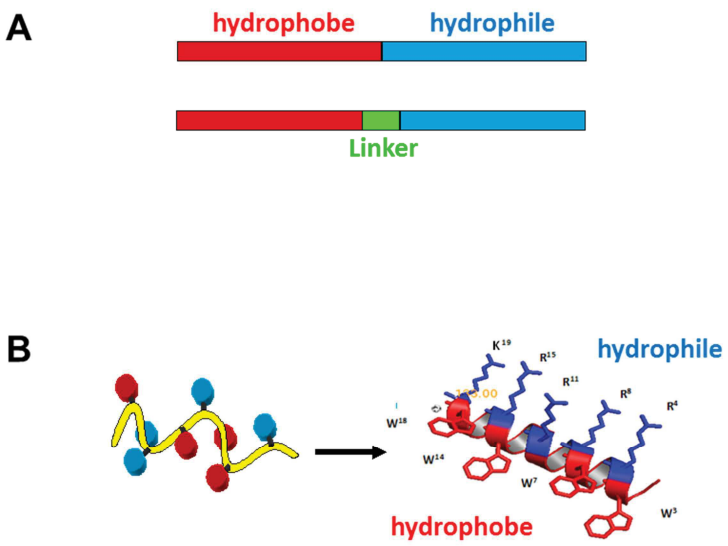


Figure 1.10 : Représentation des peptides amphipathiques. (A) Schéma d'un peptide amphipathique primaire sans ou avec un lien (« *linker* ») couplant les deux domaines. **(B)** Schéma d'un peptide amphipathique secondaire. Code couleurs : rouge = hydrophobe, bleu = hydrophile et vert = *linker*.

6.1. Peptides amphipathiques primaires

Dans un peptide amphipathique primaire, le domaine hydrophobe est principalement requis pour les interactions avec la membrane et pour former un complexe avec des molécules cargaisons hydrophobes *via* des interactions hydrophobes. Le domaine hydrophile est requis pour l'adressage de la molécule cargaison dans un compartiment cellulaire, pour la solubilisation du vecteur et du cargaison dans l'eau ou dans un tampon et pour complexer des cargaisons hydrophiles via des interactions électrostatiques (214).

Au sein de notre équipe, nous travaillons sur deux familles de peptides amphipathiques primaires : les peptides dérivés de peptide fusion (FP) qui constituent la famille MPG et les peptides dits « riches en tryptophanes » qui composent la famille Pep. Ces deux familles ont en commun le même domaine hydrophile qui dérive de la séquence de localisation nucléaire (NLS) de l'antigène T du virus simien 40 (SV40) : PKKKRKV. Ces peptides possèdent également trois résidus WSQ qui sont chargés de relier les domaines hydrophobes et hydrophiles entre eux. Cette région dite « *linker* » permet une certaine flexibilité entre les deux domaines et préserve l'intégrité de la séquence. En revanche, les familles diffèrent par la nature de leur région hydrophobe. En effet, le domaine hydrophobe provient du peptide de fusion de la protéine gp41 de VIH-1 dans le cas de la famille MPG et consiste en un motif riche en tryptophanes dans le cas de la famille Pep. Bien que dans le cas de la famille Pep la région riche en tryptophanes soit bien moins hydrophobe, les peptides de cette famille sont quand même classés parmi les peptides amphipathiques primaires. Tous ces peptides possèdent une fonction cystéamide à leur extrémité C-terminale et sont acétylés à leur extrémité N-terminale. Les peptides « leaders » de chaque famille sont MPG (148) et Pep-1 (176) respectivement pour les familles MPG et Pep.

Les peptides de la **famille Pep** sont destinés au transfert de peptides et de protéines dans les cellules. Ils sont utilisés également sous forme de complexes non covalents avec les molécules à transporter. Différents aspects des propriétés de transfection de Pep-1 ont été étudiés au niveau cellulaire. Un rapport seuil Pep-1/peptide est estimé à 5/1 et un rapport de 20/1 s'est avéré correspondre à une transfection optimale de

l'agent thérapeutique (176). L'efficacité particulière de transfection avec Pep-1 l'a conduit à être commercialisé par la Société Active Motif sous le nom de « Chariot^{TM} » et à être utilisé sur de nombreuses lignées cellulaires différentes et pour délivrer toutes sortes de peptides, protéines ou anticorps.

Les peptides de la **famille MPG** sont destinés exclusivement au transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Essentiellement utilisés sous forme de complexes avec leurs cargaisons, plusieurs peptides MPG ont montré une grande efficacité dans le transfert d'oligonucléotides. Par ailleurs, plusieurs analogues ont été développés (MPG-W, MPG-Δ^{NLS}, MPG-α) afin d'examiner la localisation intracellulaire du vecteur ainsi que l'influence de la séquence NLS et de l'état structural sur leur internalisation dans les cellules (148,175,215).

La stratégie de transfert d'oligonucléotides à partir du vecteur MPG est basée sur l'association non covalente du peptide avec l'oligonucléotide à transfecter, comme les ADNs simples et doubles brins (148,175) ou les ARNs (215,216). Les différents types de particules obtenus avec ces molécules ont été testés dans plusieurs lignées cellulaires et n'ont montré aucune toxicité jusqu'à une concentration de 0,1 mM en MPG (175). Une version plus courte de MPG, appelée MPG8, a quant à elle été validée *in vivo* pour le transport d'un siRNA dirigé contre la cycline B1, prévenant la croissance tumorale dans des souris xénogreffées par des cellules PC3 de cancer de la prostate (217). MPG est aujourd'hui commercialisé par Affimetrix sous le nom de « DeliverX^{TM} ».

6.2. Peptides amphipathiques secondaires

La famille de CADY comprend quant à elle des peptides amphipathiques secondaires. Dans cette famille on distingue CADY, dont la séquence est dérivée d'un peptide de fusion JTS1 (PPTG1) et optimisée par des substitutions de plusieurs acides aminés en tryptophane et arginine afin d'interagir avec les siRNA (152,218). Le laboratoire a par ailleurs élaboré un peptide appelé CADY2, dérivé de la séquence de CADY, et dans lequel ont été incorporés deux tandems de tryptophane-tryptophane comme observé dans la séquence de Pep-1 et deux tandems

tryptophane-phenylalanine de manières similaires à Pep-2. Ce peptide ainsi très hydrophobe et positivement chargé permet de délivrer des protéines et des peptides fluorescents dans des cellules vivantes (219). Contrairement à CADY2, CADY n'est pas capable de transfecter des peptides ou des protéines.

Par ses propriétés de transfection intéressantes de siRNA, CADY est commercialisé par Sigma-Aldrich sous le nom « N-ter^{TM} ». Nous reviendrons plus en détails sur le peptide CADY dans la suite du manuscrit.

6.3 Mécanisme d'action des vecteurs peptidiques MPG/Pep-1/CADY

Les peptides MPG, Pep-1 et CADY présentent un caractère amphipathique et une versatilité structurale directement lié à leur capacité à internaliser leur cargaison respectif : oligonucléotide, protéine/peptide et siRNA (148,152,175,176,202).Les nombreuses études, cellulaires et biophysiques, menées sur ces peptides permettent comprendre la formation des nanoparticules, d'exclure les voies d'endocytose en tant que mécanisme d'action et de proposer un modèle commun de translocation directe (Figure 1.11) (220) :

i) Interaction électrostatique et hydrophobe entre le CPP et la cargaison initiant la structuration en hélice alpha pour Pep-1 et CADY et en feuillet bêta pour MPG pour former le cœur du complexe.
ii) Stabilisation du complexe CPP/cargaison par des interactions peptide/peptide (une couche de CPP périphérique) donnant naissance aux nanoparticules d'environs 100 nm de diamètre.
iii) Interaction des nanoparticules avec les protéoglycanes à la surface de la cellule.
iv) Interactions des nanoparticules avec les phospholipides.
v) Insertion de la membrane par l'intermédiaire des peptides périphériques.
vi) Relargage dans le cytoplasme du cœur du complexe.

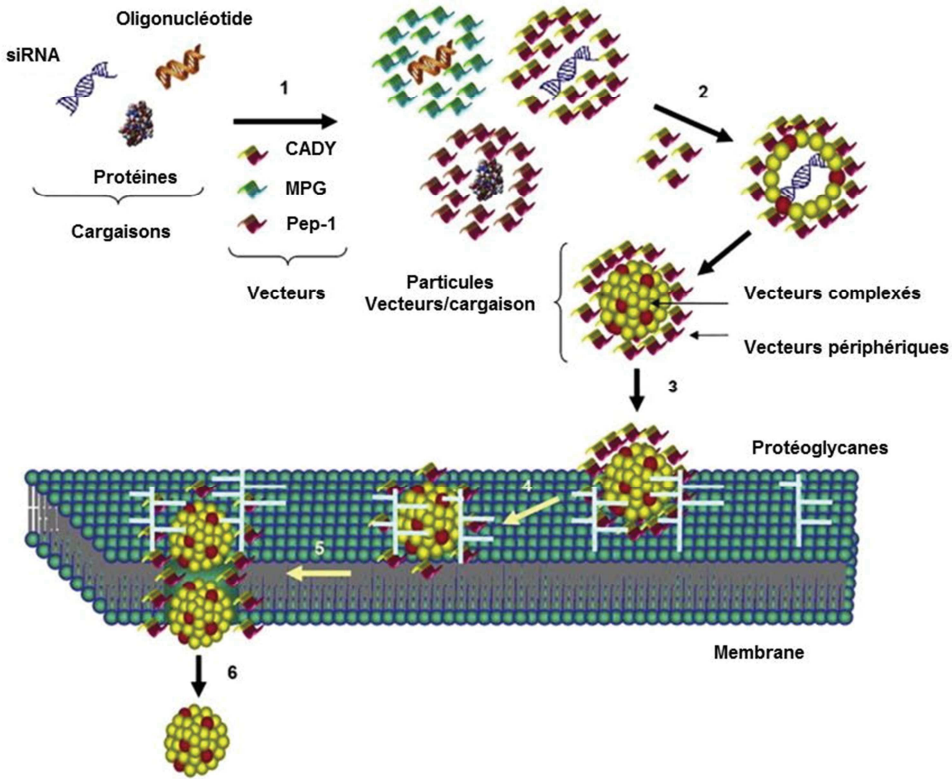


Figure 1.11 : Schéma du mécanisme d'action des peptides MPG, Pep-1 et CADY. Adaptée de (220)

Ce modèle met en évidence les étapes cruciales du mécanisme d'action de nos CPPs, cependant certains points clés des étapes 4 à 6 restent encore à déterminer. Toutefois des études sur le rôle du potentiel de membrane sur l'internalisation de MPG et Pep-1 supposent la formation de pore transitoire comme voie d'entrée (149,202).

CHAPITRE 2 – Auto-assemblage de CADY/siRNA

*Self-Assembling Peptide-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Primary Cell Lines. Deshayes, **Konate** et al., Small 8(14):2184-8, 2012.*

Les petits ARN interférents (siRNA) constituent de puissants outils biomédicaux pour la régulation spécifique de l'expression génétique au niveau post-transcriptionnel (5,221,222). Toutefois, le potentiel de ces molécules thérapeutiques est limité par leur faible internalisation *in cellulo* et leur instabilité *in vivo*. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses méthodes de délivrance ont été développées incluant les vecteurs non-viraux (11,14). Parmi eux, les CPPs ont montré un potentiel significatif pour la délivrance du siRNA *in cellulo* et *in vivo* comme le résument différentes publications et revues dans ce domaine (223–226).

Dans cette optique, nous avons récemment décrit un nouveau système de délivrance de siRNA en utilisant le peptide amphipathique secondaire CADY (152). CADY est capable de former des complexes au contact du siRNA, en combinant à la fois des interactions électrostatiques et hydrophobes. Ces complexes CADY/siRNA sont capables d'entrer dans les cellules indépendamment de toute voie d'endocytose afin d'y relarguer le siRNA.

Le protocole permettant d'obtenir des complexes CADY/siRNA comporte une unique étape de mélange du CPP avec sa cargaison (siRNA). Cet auto-assemblage spontané reste encore trop peu caractérisé à ce jour. Nous avons ainsi commencé une étude approfondie utilisant des techniques biophysiques complémentaires afin de mieux comprendre le « mécanisme » de formation de ces complexes CADY/siRNA et de caractériser de manière plus précise leur morphologie ainsi que leur stabilité au cours du temps. Les propriétés colloïdales du complexe CADY/siRNA ont été caractérisées par la technique de la diffusion de lumière (DLS) et par des mesures de potentiel zêta. Les complexes CADY/siRNA formés sont assimilables à des particules de taille nanométrique dont les spécificités sont directement liées au nombre de peptides par siRNA, également appelé ratio molaire (R). Pour le complexe CADY/siRNA (R=20/1), la taille moyenne des particules est centrée autour de 156 ± 3 nm avec une distribution des tailles plutôt homogène définie par un indice de polydispersité (IP) faible (0,37 ± 0,01). A l'inverse, les

formulations de faibles ratios molaires (5/1 et 10/1) présentent des particules instables et très hétérogènes avec des IP élevés proches de 1. Finalement, le suivi sur 3 semaines des complexes en solution (R=20/1) ne montre aucun changement de leur taille et de leur indice de polydispersité. Ces résultats sont encourageants dans l'optique d'une utilisation *in vivo* des nanoparticules car, au-delà d'être actives, les formulations nécessitent d'être homogènes et stables dans le temps.

L'analyse de la structure d'assemblage des complexes CADY/siRNA réalisée par des techniques de microscopie électronique à balayage et à force atomique fait état de particules majoritairement globulaires, et de tailles inférieures à celles mesurées par DLS. Cette différence est probablement due à l'étape de séchage nécessaire à la préparation des échantillons pour la microscopie. Une observation plus fine, confirmée par modélisation moléculaire (PepLook et Hypermatrix), indique que ces particules sont composées d'entités plus petites, autour de 20-25 nm, associées entre elles. Elles sont constituées d'un double brin d'acides nucléiques (siRNA) en interaction avec deux couches successives de peptides (~13 molécules) et présentent en surface des zones hydrophobes et hydrophiles qui permettent le maintien de ces couches peptidiques entre elles. Ainsi la formation des complexes CADY/siRNA est constituée de deux étapes : 1) l'association des peptides avec le siRNA pour créer des « grains » ; 2) l'organisation des « grains » en une structure d'assemblage plus grande pouvant ressembler à une « framboise ».

De plus, nous avons analysé le potentiel de transfection des nanoparticules CADY/siRNA sur certaines lignées cellulaires dites difficiles à transfecter, comme les cellules souches embryonnaires (mES) ou les lymphocytes Jurkat T. En déposant les nanoparticules CADY/siRNA sur ces cellules, les réponses biologiques mesurées démontrent une efficacité (*knock-down*) dose-dépendante ainsi qu'une faible toxicité pour un ratio molaire de 20/1.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence que CADY était capable d'interagir avec le siRNA et former des nanoparticules homogènes d'environ 150 nm de diamètre, stables au fil du temps, et efficaces pour la transfection de cellules humaines.

small
NANO MICRO

Self-Assembling Peptide-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Primary Cell Lines

*Sébastien Deshayes, Karidia Konate, Anna Rydström, Laurence Crombez, Cédric Godefroy, Pierre-Emmanuel Milhiet, Annick Thomas, Robert Brasseur, Gudrun Aldrian, Frédéric Heitz, Maria A. Muñoz-Morris, Jean-Marie Devoisselle, and Gilles Divita**

Short interfering RNAs (siRNAs) constitute powerful biomedical tools to specifically control protein activation and/or gene expression post-transcriptionally, and have provided great hope for therapeutic targeting of specific genes responsible for pathological disorders.[1,2] Although major progress has been made on different aspects of RNA interference (RNAi) technology, the first obstacle to siRNA clinical development remains its low cellular uptake associated with a poor in vivo stability and a lack of efficient and specific delivery systems.[3–5] Therefore, the success of siRNA therapy is highly dependent on the design of suitable delivery systems that can protect siRNA from degradation and specifically deliver it to target cells.[6,7] Numerous nonviral strategies have been proposed to improve the delivery of synthetic small oligonucleotides both in cultured cells and in vivo.[7–11] Among the potential delivery strategies, cell-penetrating peptide (CPP) technology has undergone extensive development over the last two decades, and has been widely used for covalent delivery of therapeutic molecules.[11,12] However, this approach remains limited for oligonucleotide delivery, as multiple anionic charges of the nucleic acid interact with the CPP moiety and inhibit uptake or the release of the active molecule in the subcellular compartment by steric hindrance.[10–12] We have developed an alternative noncovalent strategy for the delivery of siRNA, based on amphipathic peptides, which has been reported to improve siRNA delivery ex vivo into a large panel of cell lines and in vivo.[13–15] Ever since, the noncovalent strategy has been extended to other well-known CPP derivatives and has clearly been demonstrated to be more appropriate for siRNA delivery.[14–17]

The creation and design of nanosystems for siRNA delivery have recently gained interest because of their clinical potency.[6,7,18] Cyclodextrin-based nanovectors have been reported to be successful in vivo and at the clinical level.[18,19] We have recently described a new peptide-based delivery system for siRNA using the secondary amphipathic peptide CADY.[14] CADY is a 20-residue peptide, Ac-GLWRALWRLLRSLWRLLWKA-cya, which spontaneously self-associates when in contact with siRNA, by combining both electrostatic and hydrophobic interactions to form stable complexes that can enter cells independently of any endocytotic pathway.[14,20] In the present work, we have combined the ability of CADY to enter the cell together with its capacity to form stable nanostructures with siRNA to elaborate a potent delivery system for primary cell lines. The structural organization of CADY nanoparticles was characterized using complementary physicochemical and spectroscopic technologies. We have previously demonstrated by both spectroscopic and gel shift approaches that CADY forms highly stable nanoparticles with siRNA.[14,20] Herein, we show that CADY/siRNA self-assembling nanoparticles adopted a "raspberry"-like organization and can be successfully applied to challenging primary cell lines.

The design of self-assembling particles requires a better understanding of CADY/siRNA complex formation and of the parameters that control its structure and stability. The biophysical properties of CADY/siRNA complexes were investigated by combining several technologies: the colloidal

Dr. S. Deshayes,[+] K. Konate,[+] Dr. A. Rydström,
Dr. L. Crombez, Dr. G. Aldrian, Dr. F. Heitz, Dr. G. Divita
Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire
Department of Molecular Biophysics and Therapeutics
CNRS UMR-5237, UM1-UM2
University of Montpellier
1919 Route de Mende, 34293 Montpellier, France
E-mail: gilles.divita@crbm.cnrs.fr
C. Godefroy, Dr. P.-E. Milhiet
Centre de Biochimie Structurale
Inserm, U 554, Montpellier, France
Dr. A. Thomas, Prof. R. Brasseur
CBMN, Gembloux AgroBiotech
ULG, 2 passage des déportés, 5030 Gembloux, Belgium
Dr. M. A. Muñoz-Morris
Centro Nacional de Investigaciones Metalurgicas-CSIC
Avda Gregorio del Amo 8, 28040 Madrid, Spain
Prof. J.-M. Devoisselle
Institut Charles Gerhardt Montpellier
UMR 5253, CNRS-UM2-ENSCM-UM1, Montpellier, France
[+] These authors contributed equally to this work.

DOI: 10.1002/smll.201102413

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

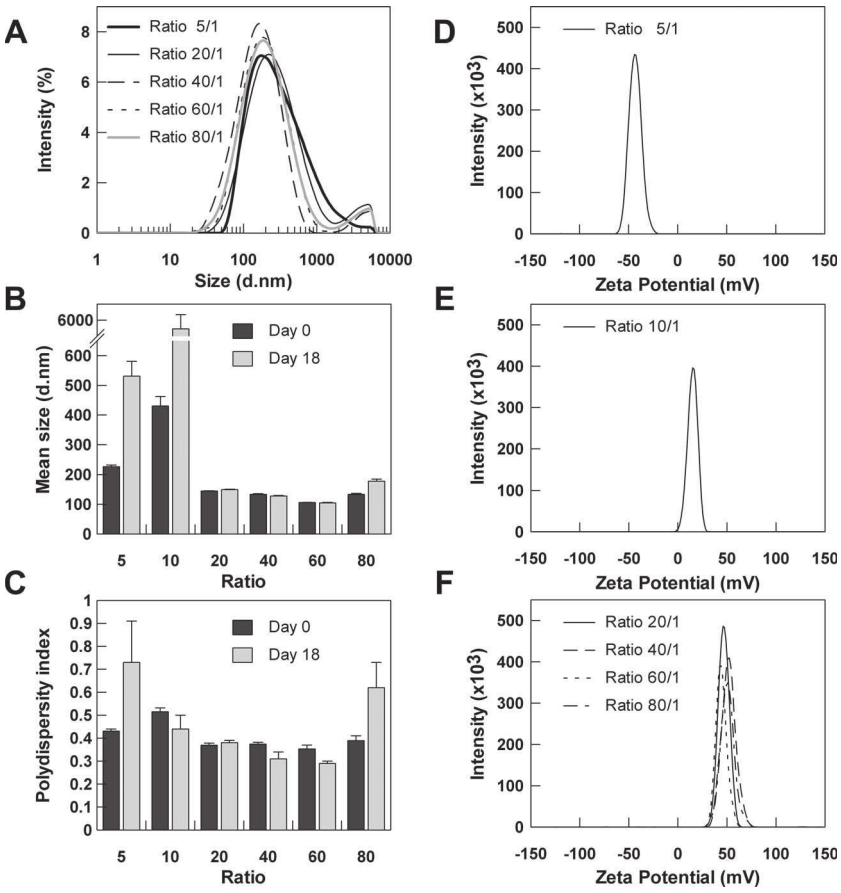


Figure 1. Characterization of CADY/siRNA nanoparticles. A) Size characterization of the CADY/siRNA particle at different molar ratios by DLS. The stability of CADY/siRNA nanoparticles was evaluated after 3 weeks of storage at 4 °C. B,C) Mean size (B) and polydispersity (C) of the particles obtained at different molar ratios (5:1 to 80:1) after day 0 (black) and 3 weeks (gray) of storage at 4 °C. D–F) Zeta potential for CADY/siRNA complexes of ratio 5:1 (D), 10:1 (E), and 20:1, 40:1, 60:1, and 80:1 (F).

features of the particles were characterized by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements (**Figure 1**).

CADY peptides are monomeric in solution and rapidly self-associate when in contact with siRNA. CADY/siRNA complexes are obtained by mixing peptides with nucleic acid in water at the required molar ratio, then diluting in salt-containing buffer (phosphate-buffered saline (PBS) 0.5×). As reported in Figure 1A, whatever the CADY/siRNA molar ratio (ranging from 20:1 to 80:1), the particles present a homogeneity in size distribution, with a mean diameter centered at 156 ± 3 nm and a polydispersity index of 0.37 ± 0.01 as measured by DLS. Size distribution analysis revealed the presence of a small proportion of large aggregates (>1 μm). Although the number of large aggregates remains quite low in solution, their presence increases the polydispersity index due to the fact that the measured intensity is 10^6-fold proportional to particle diameter.[21] In contrast, particles obtained with the lower peptide/siRNA molar ratios (5:1 and 10:1) are unstable and heterogeneous with a polydispersity index close to 1.

Since one of the major requirements for systemic in vivo application is the stability of the delivery system over time, the size and polydispersity of the CADY/siRNA complexes were followed over 3 weeks at 4 °C (Figure 1B and C). Results clearly revealed that only complexes obtained with CADY/siRNA molar ratios of 20:1, 40:1, and 60:1 preserved their size distribution (mean diameter <150 nm and polydispersity index <0.35) and remained stable over time. In contrast, at ratios 5:1, 10:1, and 80:1 significant increases in particle size distribution and heterogeneity associated with particle aggregation were observed over time (Figure 1B and C). Measurements of CADY/siRNA particle charge by zeta potential (Figure 1D–F) indicate that particles formed at 5:1 molar ratio exhibit a negatively charged surface with a zeta potential value of –45.7 ± 2.3 mV (Figure 1D), whereas particles obtained at higher peptide/siRNA molar ratios are positively charged (Figure 1E and F). The negative zeta potential of particles obtained at 5:1 molar ratio emphasizes a distinct organization of complexes with exposed siRNA molecules at the surface, which is in perfect agreement with the low stability of the particles obtained at that ratio. Zeta potential values obtained for 20:1, 40:1, 60:1, and 80:1 molar ratios are quite similar, with values of 46.0 ± 0.8, 51.9 ± 1.0, 45.1 ± 0.9, and 48.5 ± 2.2 mV, respectively. An average zeta potential value of 15.4 ± 0.6 mV was obtained for the particle formed at a 10:1 molar ratio (Figure 1E). A value of +/–25 mV has been proposed as the arbitrary value that separates low-charged surfaces from highly charged surfaces.[21] Beyond this value (negative or positive) particles are electrically stabilized, while particles with low zeta potential values tend to coagulate or flocculate.

Thus, the low zeta potential of 10:1 ratio complexes clearly indicates instability whereas the zeta potential for the other ratios suggests a net stability of particles. The fact that particles from ratio 20:1 to 80:1 exhibit a comparable positively charged surface demonstrated that particle organization reaches an equilibrium at ratio 20:1, with CADY peptides distributed at the surface of complexes exposing their positive Arg and Lys residues outwards. Therefore, the rest of this study was focused on particles obtained at molar ratios 20:1 and 40:1.

CADY/siRNA nanoparticles were further characterized by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM; **Figure 2**). Analysis of CADY/siRNA complexes revealed homogeneously distributed small globular particles with an average diameter of 70 ± 8 nm (ratio 20:1) and 80 ± 12 nm (ratio 40:1; Figure 2A–D). SEM usually involves dried samples, which can explain the presence of particles smaller than those identified in solution. At both 20:1 and 40:1 molar ratios, SEM images indicated that the

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

DOI: 10.1002/smll.201102413

NANO MICRO small

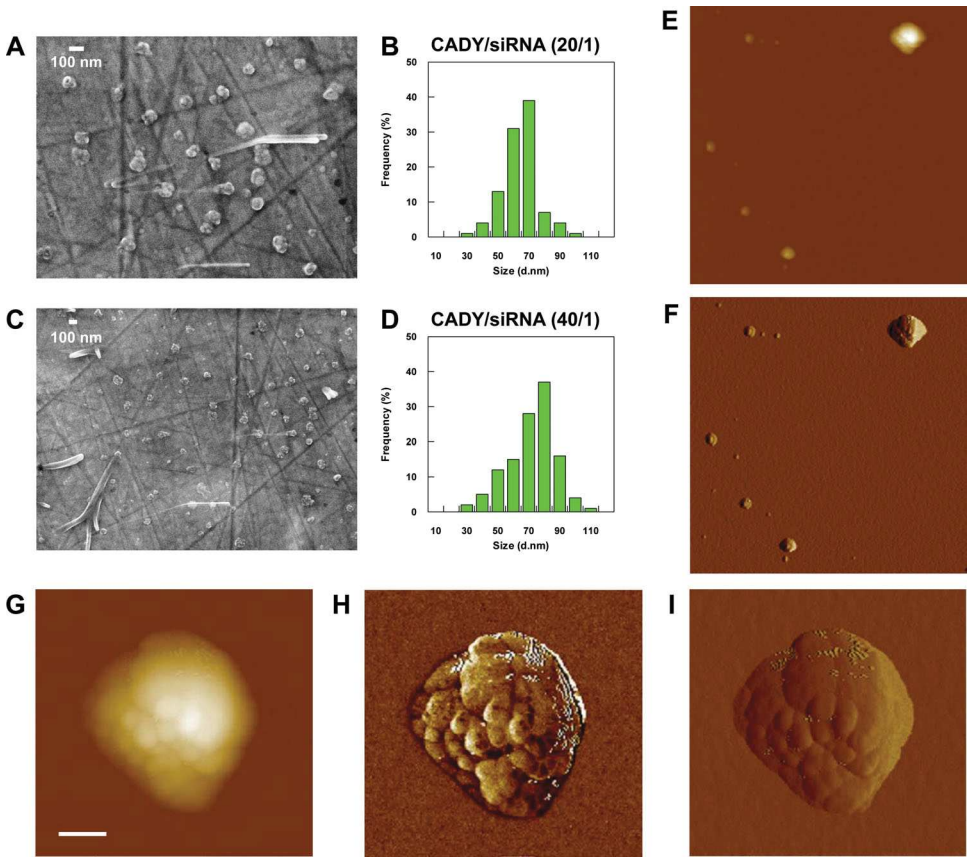


Figure 2. Structural investigation of CADY/siRNA nanoparticles. A) SEM image of typical CADY/siRNA particles at ratio 20:1; B) the corresponding distribution of particle size. C) SEM image of typical CADY/siRNA particles at ratio 40:1; D) the corresponding distribution of particle size. AFM images of E) height and F) amplitude of a 1.5 µm scan (*z* scale, 50 nm). Higher magnification clearly shows that large CADY/SiRNA particles are composed of globular structures with a 25 nm diameter. G) Height image (50 nm, *z* scale); H) a 3D view of (G); I) the corresponding phase image (18° scale). Scale bar in (G): 50 nm.

globular shape of the particle resulted from the assembly of several smaller entities (Figure 2A–C).

CADY/siRNA complexes at 40:1 molar ratio were imaged by AFM, the height and amplitude scan of a 1.5×1.5 µm field (Figure 2E–I) revealing a scattered distribution of particles. The main population of particles was characterized by a half-height width of 130 nm and a height around 50 nm (Figure 2G–I). As reported for SEM measurement, magnification revealed that the particles were formed by association of smaller spherical elements of size 20–25 nm constituting a "raspberry"-shaped particle (Figure 2G–I). Smaller particles of size 20–25 nm were also observed, corresponding to the size of the "drupelet" of the raspberry.

The structure of the CADY/siRNA complex has been calculated computationally using PepLook[22] and Hypermatrix[23] (**Figure 3**). By using fluorescence spectroscopy, we have demonstrated that CADY/siRNA saturation occurs for a CADY/siRNA molar ratio of 12:1.[14,20] Irrespective of the initial CADY 3D structures, the model demonstrates that the driving force of CADY/siRNA interactions is CADY arginine and lysine/siRNA phosphate salt bridges and that 10 to 13 peptides interact directly with one siRNA molecule (Figure 3A). Complexes at 20:1 or 40:1

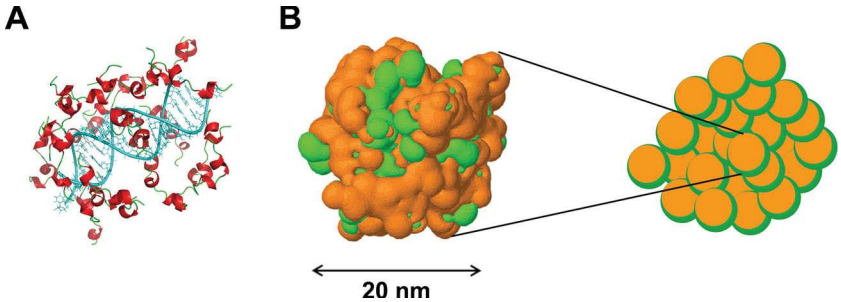


Figure 3. Molecular modeling of CADY/siRNA nanoparticles. The structure of CADY/siRNA was calculated using PepLook and Hypermatrix. "Raspberry" nanoparticles are composed of smaller "drupelets" corresponding to CADY/siRNA complexes which involve 13 to 17 peptides surrounding the siRNA. A) Ribbon representation of the CADY/siRNA complex structure including the siRNA molecule in blue and CADY peptide in red (helical motif) and green (coil motif). B) Surface representation of CADY/siRNA showing hydrophilic and hydrophobic surfaces in green and orange, respectively.

DOI: 10.1002/smll.201102413
© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

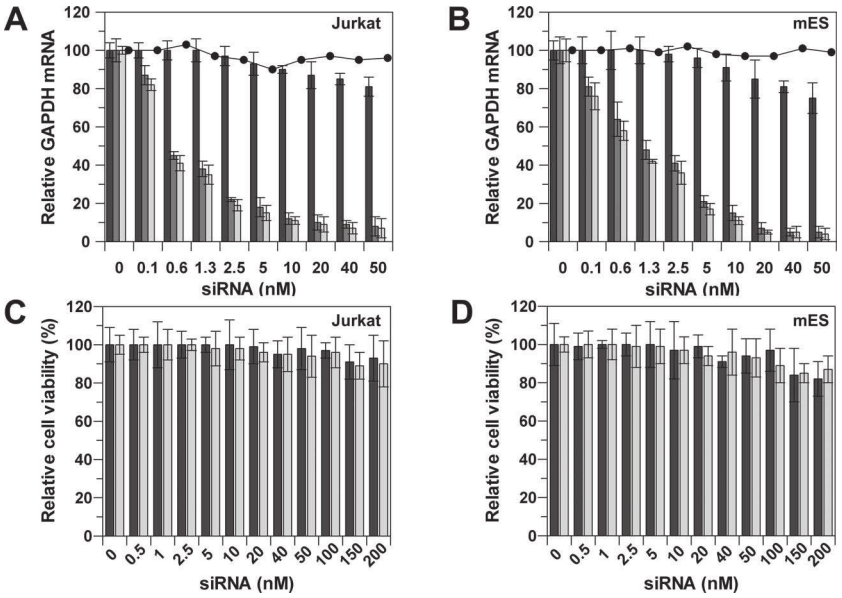


Figure 4. CADY-mediated delivery of siRNA into challenging cell lines. Stock solutions of CADY/siRNA particles were prepared at molar ratios of 1:10, 1:20, and 1:40, and lower concentrations (from 200 to 0.125 nM) were obtained by serial dilution of the stock solution in PBS. Jurkat and mSE cells (60% confluency) were overlaid with preformed complexes for 30 min, then fresh Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) was added directly to the cells. GAPDH mRNA levels were measured 12 h after transfection using Quantigen technology. A) Dose responses of GAPDH silencing at mRNA levels in suspended T lymphocyte cells (Jurkat T) for CADY/siRNA at molar ratios of 10:1 (black), 20:1 (gray), and 40:1 (white). B) GAPDH mRNA levels in mES cells for CADY/siRNA at molar ratios of 10:1 (black), 20:1 (gray), and 40:1 (white). In both cases, the level of cyclophilin B mRNA (black circles) was used as a positive control to follow cell viability. The toxicity of CADY/siRNA particles was investigated by MTT assay. C) Jurkat and D) mES cells were treated with increasing concentrations of CADY/siRNA particles at ratios of 1:20 (black) and 1:10 (gray) ranging from 0.5 to 200 nM and toxicity was then evaluated 24 h after treatment. Reported data correspond to the average of three separate experiments.

molar ratios constitute an 11 × 78 nm globular particle, with the siRNA covered by at least two layers of peptides, which results in a surface exposing hydrophilic and hydrophobic residues (Figure 3B). The polymorphism of CADY is important for the complex to adapt external conditions and expose a constant density of accessible positive charges, as suggested by zeta potential measurements. We therefore suggest that this complex constitutes the "drupelets" of the "raspberry" which are cemented together thanks to other CADY peptide molecules (Figure 3B).

We previously reported that CADY peptides are able to efficiently deliver siRNA in cultured cell lines.[14,25] So far very few strategies have succeeded in the efficient delivery of siRNA into embryonic stem cells.[26,27] Transfection failure in these cell lines is often associated with cytotoxic effects of the delivery agents and the need to perform transfection in serum-free medium. We therefore chose to apply optimized CADY/siRNA self-assembling nanoparticles to mouse embryonic stem (mES) cells and T lymphocytes (Jurkat T) that have been reported challenging to transfect and highly sensitive to transfection reagents. CADY/siRNA self-assembling nanoparticles were evaluated for the delivery of siRNA targeting a housekeeping gene (GAPDH; **Figure 4**). CADY/GAPDH-siRNA complexes formed at a molar ratio of 10:1, 20:1, and 40:1 were applied in serum-containing medium and the siRNA dose response associated with GAPDH knockdown was followed at both protein and mRNA levels. CADY-mediated delivery of sub-nanomolar concentrations of siRNA led to significant knockdown of the GAPDH target gene. For molar ratios of 20:1 and 40:1, the GAPDH-mRNA level was reduced by more than 85% with a concentration of 20 nM siRNA, irrespective of the cell type, and IC_{50} values of about 1.2 ± 0.1 and 5.4 ± 0.5 nM were estimated for Jurkat T (Figure 4A) and mES (Figure 4B) cells. In contrast, a poor response was measured at 10:1 CADY/siRNA molar ratio, thus confirming the low stability of CADY/siRNA particles formed at that ratio. The impact of CADY/siRNA nanoparticles on cell viability was followed by monitoring the level of a control mRNA (cyclophilin B) and by MTT assays. In both cases, no significant toxicity associated with CADY/siRNA was observed, with cell viability greater than 85% in all cell lines up to a concentration of 200 μM (data not shown).

Therapeutic siRNA delivery constitutes a highly challenging task as side effects, off targets, and toxicity have been associated with high siRNA doses and the type of delivery systems used.[4,5] Recently, nanoparticles have been reported to provide hope for siRNA delivery and its clinic development.[19] Herein, we have described new, potent, self-assembling nanoparticles for efficiently delivering siRNA into embryonic stem cells and challenging cell lines. We have demonstrated that the CADY-based siRNA assembly consists of a "core shell" of peptide interacting directly with siRNA, which is further cemented together by a surface layer of carrier that stabilizes the architecture of the particle. The CADY/siRNA complexes are stable and can be applied to cultured cells. The robustness of the biological response achieved through this approach infers that peptide-based nanoparticle technology holds a strong promise for therapeutic administration of siRNA.

Experimental Section

Peptides and siRNA: CADY peptide (Ac-GLWRALWRLLRSLWRLLWKA-cya) was synthesized by solid-phase peptide synthesis on an Fmoc continuous-flow apparatus (Pioneer, Applied Biosystems, Foster City, CA) starting from Expansin resin bearing a homemade AEDI linker and purified as described previously.[14,20] Cyc-B1 siRNA targeting cyclin B1 (sense strand Cyc-B1 5′-GGCGAAGAUCAACAUGGCATT-3′), the derived siRNA harboring two mismatches (sense strand Cyc-B3 5′-GGUGAAGAUCAGCAUGGCATT-3′), and a siRNA targeting GAPDH (sense strand 5′-CAUCAUCCCUGCCUCUACUTT-3′) were obtained from Eurogentec (Belgium). Stock solutions of siRNA were prepared at 100 μM concentrations in 50 mM Tris/0.5 mM EDTA buffer.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
small 2012,
DOI: 10.1002/smll.201102413

NANO MICRO small

CADY/siRNA particles were prepared in pure water by mixing different volumes of peptide and nucleic acid stock solutions for final molar ratios of 10:1, 20:1, 40:1, 60:1, and 80:1.

Biophysical Characterization: The size and zeta potential of CADY/siRNA complexes were determined by DLS with a Malvern Nanosizer ZS device in pure water and in a 5 mM NaCl solution. The shape and dimensions of particles were also identified by SEM using a JEOL6500F instrument or by AFM using the tapping mode in air with a multimode microscope equipped with a Nanoscope V controller (NanoBrucker).[28] AFM imaging was performed with AC160TS Olympus cantilevers.

Molecular Modeling: 3D models of CADY were calculated from the primary sequence using PepLook.[23] The procedure for calculating siRNA/CADY complexes was derived from the Hypermatrix 2D procedure for pairing molecules in membranes.[24] The protocol was modified to achieve docking of a moving 3D CADY model in three dimensions around an immobile 3D model of siRNA.

Cell Culture: Jurkat T and mES cell lines obtained from ATCC were cultured in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 1% antibiotics (streptomycin 10 000 μg mL^{-1}, penicillin 10 000 IU mL^{-1}), and 10% (w/v) FCS at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Stock solutions of CADY/siRNA particles were prepared by complexing 100 nM siRNA with CADY peptides at a molar ratio of 1:20 or 1:40 for 30 min at 37 °C. Lower concentrations of CADY/siRNA (from 20 to 0.125 nM) were obtained by serial dilution of the stock complexes in PBS, to preserve the same CADY/siRNA ratio. Cells (150 000) seeded in a 35 mm dish the day prior to transfection were grown to 60% confluence and overlaid with preformed complexes (200 μL), incubated for 3–5 min, and DMEM (400 μL) was added. After 30 min of incubation at 37 °C, fresh DMEM (1 mL) containing 16% FCS was added to reach a final FCS concentration of 10%, without removing the overlay of CADY/siRNA complexes. Cells were returned to the incubator for 24 h. The GAPDH mRNA level was determined using Quantigen (Panomics Inc.). Data reported are an average of three or four distinct experiments.

Cytotoxicity Measurements: The toxicity of CADY/siRNA complexes was investigated on Jurkat T and mES cell lines. Cells (30 000) seeded in 24-well plates 24 h prior to transfection were incubated with increasing concentrations of siRNA complexed with CADY at a 20:1 molar ratio ranging from 0.1 to 200 nM (1–4 μM CADY) for 30 min prior to addition of medium to reach a final 10% concentration of FCS. Cytotoxic response was measured 24 h later by monitoring the housekeeping gene cyclophilin mRNA level (Quantigen, Panomic Inc.) and by colorimetric MTT assay (Sigma, Germany), respectively. For MTT assay, the cell culture medium was removed and replaced with PBS containing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 2.5 mg mL^{-1}) for 4 h. Results correspond to the average of three separate experiments.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-BLAN-0071). We thank Dr. May C. Morris (CRBM-UMR5237-CNRS) for critical reading of the manuscript and all members of the laboratory and our collaborators for fruitful discussions. We thank G. McMaster and Q. Nguyen at Panomics Inc. for their expertise in Quantigen technology.

[1] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1988**, *391*, 806.
[2] Y. Dorsett, T. Tuschl, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 318.
[3] K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Rev Drug Discovery* **2009**, *8*, 129.
[4] D. Castanotto, J. J. Rossi, *Nature* **2009**, *457*, 426.
[5] A. De Fougerolles, H.-P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 443.
[6] X. L. Wang, R. Xu, X. Wu, D. Gillespie, R. Jensen, Z. R. Lu, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 738.
[7] C. R. Sibley, Y. Seow, M. J. Wood, *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 466.
[8] R. Juliano, M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4158.
[9] A. Eguchi, S. F. Dowdy, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 341.
[10] K. Gao, G. Huang, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 651.
[11] F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195.
[12] P. Järver, I. Mäger, Ü. Langel, *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *11*, 528.
[13] F. Simeoni, M. C. Morris, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2717.
[14] L. Crombez, G. Aldrian-Herrada, K. Konate, Q. N. Nguyen, G. K. McMaster, R. Brasseur, F. Heitz, G. Divita, *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 95.
[15] L. Crombez, M. C. Morris, S. Dufort, G. Aldrian-Herrada, Q. N. Nguyen, G. K. McMaster, J. L. Coll, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4559.
[16] A. Eguchi, B. R. Meade, Y. C. Chang, C. T. Fredrickson, K. Willert, N. Puri, S. F. Dowdy, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 567.
[17] S. El Andaloussi, T. Lehto, I. Mäger, K. Rosenthal-Aizman, I. I. Oprea, O. E. Simonson, H. Sork, K. Ezzat, D. M. Copolovici, K. Kurrikoff, J. R. Viola, E. M. Zaghloul, R. Sillard, H. J. Johansson, F. Said Hassane, P. Guterstam, J. Suhorutšenko, P. M. Moreno, N. Oskolkov, J. Hälldin, U. Tedebark, A. Metspalu, B. Lebleu, J. Lehtiö, C. I. Smith, Ü. Langel, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3972.
[18] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature* **2010**, *464*, 1067.
[19] M. E. Davis, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 659.
[20] K. Konate, L. Crombez, S. Deshayes, A. Thomas, R. Brasseur, G. Aldrian-Herrada, F. Heitz, G. Divita, *Biochemistry* **2010**, *49*, 3393.
[21] Zeta Potential of Colloids in Water and Waste Water. ASTM Standard D, 4187-82, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, USA **1985**.
[22] A. Thomas, S. Deshayes, M. Decaffmeyer, M. H. Van Eyck, B. Charloteaux, R. Brasseur, *Proteins* **2006**, *65*, 889.
[23] R. Brasseur, in *Molecular Description of Biological Membranes by Computer-Aided Conformational Analysis* (Ed: R. Brasseur), CRC, Boca Raton **1990**, 203.
[24] S. Deshayes, K. Konate, G. Aldrian, L. Crombez, F. Heitz, G. Divita, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 2304-1
[25] A. Rydström, S. Deshayes, K. Konate, L. Crombez, K. Padari, H. Boukhaddaoui, G. Aldrian, M. Pooga, G. Divita, *PLoS One* **2011**, *6*, e25924.
[26] H. Zaehres, M. W. Lensch, L. Daheron, S. A. Stewart, J. Itskovitz-Eldor, G. Q. Daley, *Stem Cells* **2005**, *23*, 299.
[27] M. Ø. Andersen, J. V. Nygaard, J. S. Burns, M. K. Raarup, J. R. Nyengaard, C. Bünger, F. Besenbacher, K. A. Howard, M. Kassem, J. Kjems, *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 2018.
[28] P. E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieu, P. Dosset, C. Le Grimellec, J. M. Verdier, S. Marchal, T. Ando, *PLoS One* **2010**, *5*, e13240.

Received: November 6, 2011
Published online:

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CHAPITRE 3 – Développement des analogues de CADY

1. Introduction générale

Dans le domaine de la délivrance de molécules thérapeutiques, le but majeur des chercheurs est d'améliorer le potentiel d'internalisation cellulaire des vecteurs tout en minimisant les éventuels effets délétères (toxicité, instabilité des produits délivrés, etc.) Mais comment peut-on définir la séquence idéale d'un vecteur peptidique ? Aujourd'hui la prédiction de l'efficacité de transfection d'une séquence peptidique n'est pas systématique malgré le développement croissant de logiciels qui y sont dédiés (ex : CellPPD, (227)). Le groupe du Prof. Ü. Langel a d'ailleurs été l'un des premiers à développer des algorithmes pour élaborer de nouveaux CPPs. En parallèle, plusieurs groupes ont mené des analyses de relations structure/activité (SAR – *structure activity relationship*) de leurs vecteurs et de plusieurs analogues afin de mieux comprendre l'influence de la séquence primaire sur l'internalisation cellulaire. *In fine*, cette recherche accrue sur l'influence de la séquence des CPPs ainsi que sur leur mode de transfection a pour objectif d'obtenir des outils de délivrance performants pour une application clinique.

Dans ce contexte, une partie de mes travaux a été dédiée à l'analyse des relations structure/activité à travers le design d'analogues de CADY dans le but de délivrer plus efficacement du siRNA *in cellulo*.

La séquence primaire de CADY (cf. Tableau 3.1) joue un rôle essentiel dans la formulation des nanoparticules CADY/siRNA, l'internalisation cellulaire et sa capacité à relarguer sa cargaison. En présence de différents partenaires (ex : lipides, siRNA), CADY adopte une conformation hélicoïdale observable par dichroïsme circulaire (CD) et par modélisation moléculaire, *in silico* (cf. CHAPITRE 2). Dans sa conformation hélicoïdale, on distingue trois zones principales (Figure 3.1).

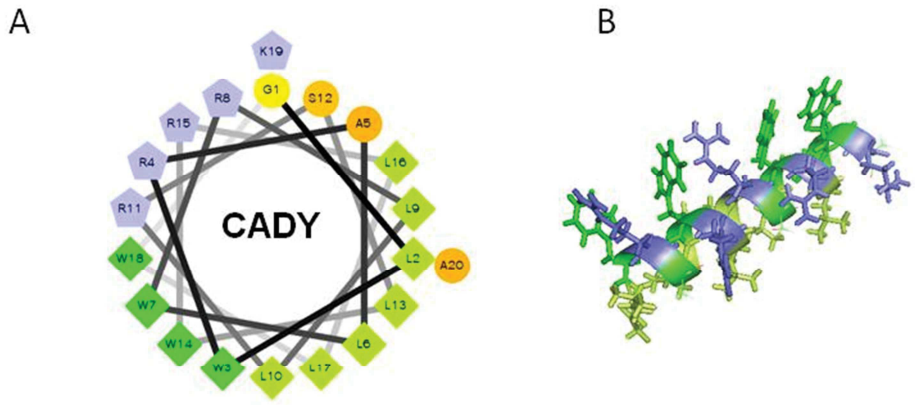


Figure 3.1 : Projection hélicoïdale et conformation 3D de la séquence de CADY. (**A**) La représentation hélicoïdale de la séquence de CADY réalisée à l'aide du logiciel « *Helical Wheel* » montre 3 zones distinctes : une zone hydrophobe riche en leucine (vert clair), une zone aromatique riche en tryptophane (vert foncé) et une zone hydrophile riche en arginine (violet). (**B**) La représentation de la structure 3D de CADY calculée à l'aide du logiciel informatique « *I-Tasser* » montre une conformation hélicoïdale du peptide dans sa configuration la plus énergétiquement stable. On distingue une zone riche en leucine (vert clair) à l'opposé des deux autres zones, riches en tryptophane (vert foncé) et en arginine (violet), plus proches dans l'espace.

La distinction de ces différentes zones est importante car elles ont des fonctions définies pour les interactions intra- et intermoléculaires :

1) La zone riche en résidus arginine (R) : Les charges positives des arginines ainsi que celle du résidu lysine (K) sont importantes pour les interactions avec les charges négatives des groupements phosphate du siRNA (153,228). Une fois que le complexe CADY/siRNA est formé, les R à la surface de la nanoparticule jouent un rôle majeur lors de l'internalisation, car ils sont responsables des premières interactions avec les glycosaminoglycanes (GAG) riches en groupements sulfates retrouvés en abondance dans la matrice extracellulaire. De plus, ces zones hydrophiles riches en R peuvent renforcer les interactions avec les lipides quand ceux-ci sont anioniques afin de faciliter l'internalisation des nanoparticules (153).
2) La zone riche en résidus tryptophane (W) : Les tryptophanes présents dans la séquence des CPPs sont des résidus moteurs favorisant les interactions avec les lipides membranaires de la cellule (153,185) mais dans le cas de CADY,

ils contribuent aussi à la stabilisation du complexe CADY/siRNA par des interactions hydrophobes avec les petits sillons des acides nucléiques double brin (228).

3) La zone riche en résidus leucine (L) : Les leucines sont impliquées dans les interactions hydrophobes peptide-peptide qui permettent l'autoassemblage des complexes CPP/siRNA sous la forme de nanoparticules (cf. CHAPITRE 2).

CADY est un peptide qui n'acquiert ses propriétés de peptide amphipathique secondaire que lorsqu'il est en conformation hélicoïdale. Dans une étude précédente (153), afin de mieux comprendre la formation de cette hélice, la structure de CADY a été modulée *in silico* sous trois conditions différentes (interface eau, lipide neutre ou chargée) à l'aide du logiciel PepLook (229). Cette étude indique que quel que soit l'environnement, hydrophobe ou mimant les lipides, les modèles obtenus comportent toujours une zone hélicoïdale plus ou moins grande, initiée à partir du fragment R^8LLR^{11}. Une fois que l'hélice est formée, celle-ci est probablement stabilisée par des interactions de type π–*stacking* entre deux W ainsi que par des interactions de type π–cation entre W et R/K. Ce sont des interactions non covalentes dues au recouvrement des orbitales π de cycles aromatiques avec d'autres cycles aromatiques (π–*stacking*), ou avec des ions (π–*cation*). Comme l'indique la Figure 3.1 (B), la structure de CADY proposée par le logiciel « *I-Tasser* » semble être stabilisée respectivement par des interactions π-cation entre les résidus W^3 et R^4 ($W^3 \rightarrow R^4$), W^7 et R^{11} ($W^7 \rightarrow R^{11}$), ainsi que par des interactions sous forme de π-*stacking* entre W^{14} et W^{18} ($W^{14} \leftrightarrow W^{18}$). Ce modèle, consolidé par des essais expérimentaux (153), démontre que la formation d'une hélice amphipathique est la structure privilégiée de CADY.

Pour mieux comprendre l'influence des différents résidus de la séquence de CADY sur les interactions CADY/siRNA et CADY/lipide ainsi que sur l'efficacité de vectorisation *in cellulo*, nous avons conçu des analogues de CADY. Nous avons introduit des mutations dans la séquence primaire pouvant créer un déséquilibre des interactions de type π–*stacking* ou π–*cation* ainsi que de la conformation hélicoïdale du peptide.

2. Conception des vecteurs peptidiques analogues de CADY

La conception des analogues de CADY s'est effectuée en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons évalué la nécessité de la fonction cystéamide (Cya) en position C-terminale du peptide et dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur la zone riche en tryptophanes et la zone R^8LLRS^{12} initiant la formation de l'hélice pour introduire de nouvelles mutations.

2.1. Rôle du cystéamide en position C-terminal de CADY

Les premières générations de vecteurs amphipathiques de l'équipe possédaient une fonction cystéamide (-CH2-CH2-SH) en position C-terminale du peptide, comme décrit pour Pep-1 ou MPG et leurs différents analogues (148,175). Une étude a montré l'importance de cette fonction cystéamide (Cya) pour la transfection d'un plasmide codant la luciférase. A l'aide du peptide MPG-Cya, on observe un niveau d'expression 1000 fois plus élevé comparé à son analogue sans cystéamide (215). Cette étude suggère que la fonction Cya stabilise les interactions peptide-cargaison de la nanoparticule augmentant ainsi son internalisation cellulaire. Ce rôle peut être attribué à la fonction thiol du cystéamide. En effet, les fonctions thiols peuvent former des ponts disulfures entre les peptides vecteurs et permettre ainsi une stabilisation des complexes. Ce type de comportement a déjà été observé lors du transfert de gènes par des peptides possédant des cystéines (230).

CADY possède aussi un groupement cystéamide sur la partie C-terminale de sa séquence mais, jusqu'à ce jour, son rôle et sa nécessité n'avaient pas été évalués. Une version sans cystéamide, CADY-[Cya], a donc été synthétisée, complexée au siRNA et comparée en termes de taille moyenne de particules et d'indice de polydispersité (IP) aux complexes CADY/siRNA (Figure 3.2).

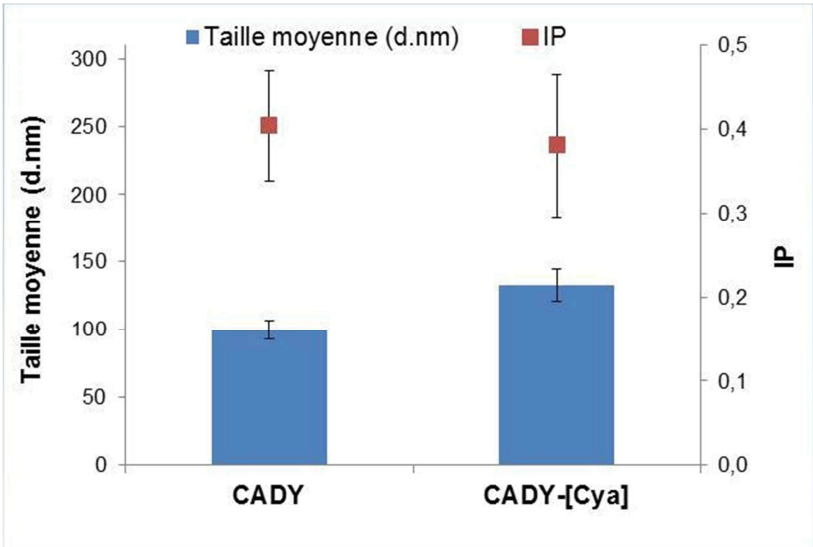


Figure 3.2 : Evaluation de la taille moyenne et de l'indice de polydispersité des complexes CADY/siRNA et CADY-[Cya]/siRNA. Les complexes sont formulés dans une solution aqueuse à 5% de glucose à un ratio molaire de 40/1. Les tailles moyennes (diamètre en nm) et les indices de polydispersité (IP) sont mesurés par la diffusion de lumière (DLS), indiquant des valeurs similaires pour CADY et sa version sans cystéamide.

Les nanoparticules formées avec CADY ou CADY-[Cya] en présence de siRNA montrent des tailles moyennes (100 ± 7 nm *versus* 133 ± 12 nm) et des indices de polydispersité (0,404 ± 0,065 *versus* 0,381 ± 0,084) qui ne sont pas sensiblement différents. De ces mesures, on peut conclure que la fonction cystéamide n'influence pas la formation des nanoparticules. Ces résultats *in vitro* ont pu être confortés par des mesures de « *knock-down* » de luciférase *in cellulo* effectuées sur des cellules murines de mélanome B16-Luc+ ne montrant pas de différence d'activité entre les nanoparticules CADY/siRNA-Luc et CADY-[Cya]/siRNA-Luc (résultats non-montrés).

Afin de réduire les coûts et de faciliter la synthèse peptidique, nous avons donc opté pour le développement d'analogues de CADY qui n'incorporent pas la fonction cystéamide en position C-terminale.

2.2. Choix des analogues de CADY

L'efficacité de transfection des peptides vecteurs est directement liée à leur mécanisme d'internalisation. Nous avons donc conçu des analogues afin de mieux

comprendre ce mécanisme et ainsi développer des peptides vecteurs plus performants.

Les mutations ont été choisies de manière à valider l'importance de la structuration en hélice alpha et de la zone fonctionnelle riche en tryptophanes pour la formulation des complexes CPP/siRNA et pour l'efficacité d'internalisation *in cellulo*. Cela nous a conduits à développer les peptides vecteurs suivants (Tableau 3.1):

- La famille des **PSF** : Pour ces analogues, les substitutions consistent à échanger successivement les tryptophanes de la séquence de CADY par des phénylalanines (F) : $W^3 \rightarrow F$ (=PSF1), $W^7 \rightarrow F$ (=PSF2), $W^{14} \rightarrow F$ (=PSF3). Le tryptophane présente la plus grande zone de surface non polaire, il est le résidu le plus polarisable possédant un groupement indole (N-H) capable de former des liaisons hydrogène (231,232). Ces propriétés ont un rôle important dans les interactions avec les lipides membranaires. Le remplacement des tryptophanes par des phénylalanines a pour objectif de confirmer cette interaction plutôt spécifique des tryptophanes. Le résidu F est constitué d'un noyau aromatique type benzène dont les atomes d'hydrogène ne sont pas capables de former des liaisons hydrogène avec d'autres partenaires. Par contre tout comme W, son noyau aromatique peut contribuer à maintenir la structuration en hélice favorisée par les phénomènes de π-*stacking* ou de π-cation liés à la présence des noyaux aromatiques.

Les analogues de substitution comprenant un remplacement de W^{18} (=PSF4) ainsi qu'un remplacement total de tous les tryptophanes par des phénylalanines (PSF-total), ont été envisagés mais ces séquences n'ont pu être synthétisées par la société GLS.

- **PSW** : Cet analogue de CADY possède une mutation unique sur un résidu leucine, L^{10}, qui est substitué par un résidu tryptophane dans la zone R^8LLR^{11} initiatrice d'hélice. On pense que l'ajout d'un tryptophane supplémentaire pourrait en effet aider à améliorer les interactions avec les lipides membranaires.

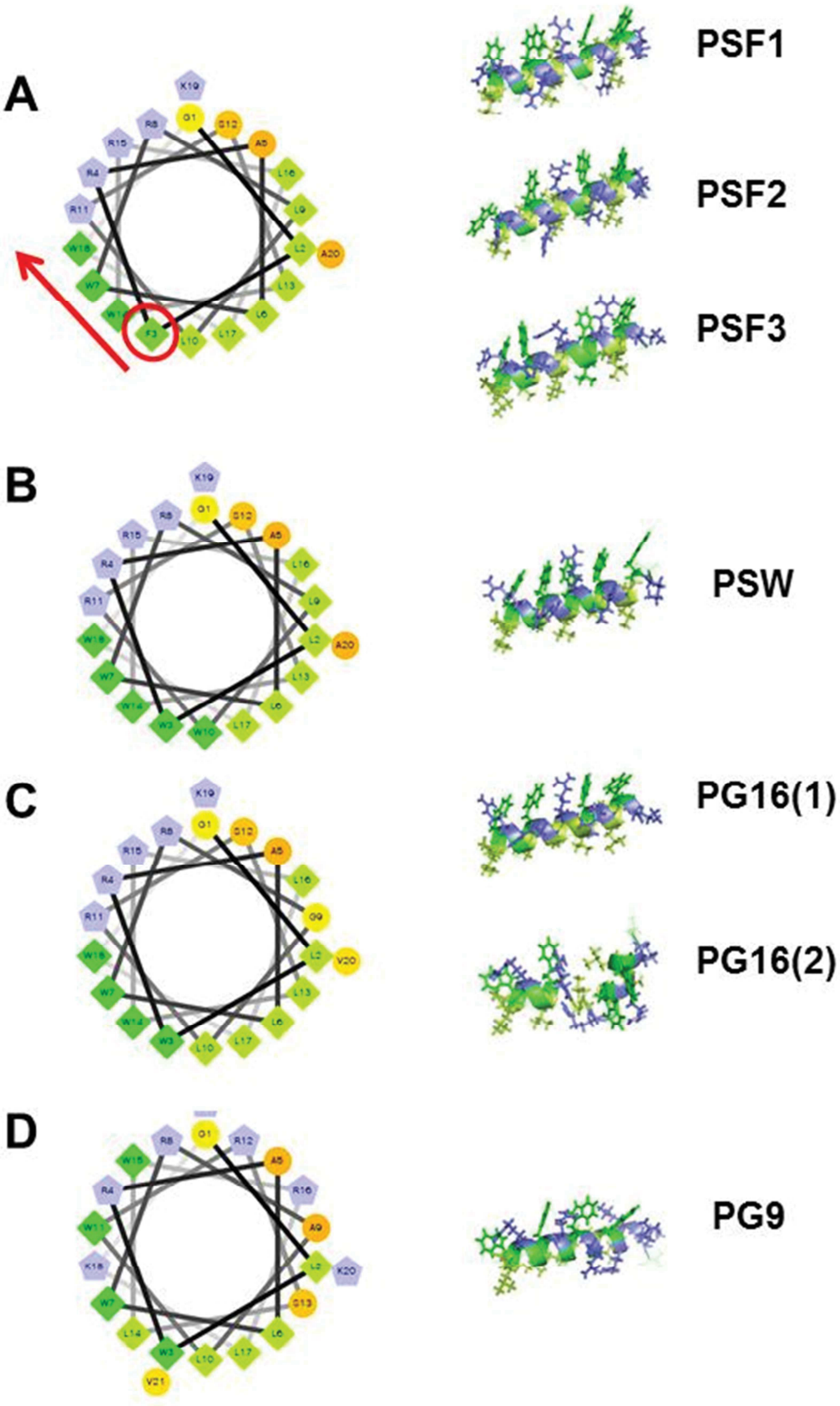
- **PG16** : Ce peptide possède deux mutations. L'une concerne le remplacement d'une leucine (L^9) par une glycine dans la zone initiatrice d'hélice et l'autre le remplacement d'une alanine (A^{20}) par une valine augmentant légèrement le caractère hydrophobe de la région C-terminale.

Tableau 3.1 : Présentation des séquences des analogues de CADY

Nom	Séquence	Nombre de résidus	Nombre de charge
CADY	GLWRALWRLLRSLWRLLWKA –Cya	20	6
CADY-[Cya]	GLWRALWRLLRSLWRLLWKA	20	6
PSF1	GL**F**RALWRLLRSLWRLLWKA	20	6
PSF2	GLWRAL**F**RLLRSLWRLLWKA	20	6
PSF3	GLWRALWRLLRSL**F**RLLWKA	20	6
PSW	GLWRALWRL**W**RSLWRLLWKA	20	6
PG16	GLWRALWR**G**LRSLWRLLWK**V**	20	6
PG9	GLWRALWR**A**L**W**RSLWRL**KRKV**	21	8

- **PG9** : Cette séquence contient plusieurs mutations. Comme pour PG16, la leucine (L^{9}) a été remplacée, mais cette fois-ci par une alanine. Le deuxième changement concerne la partie C-terminale où les quatre derniers acides aminés ($L^{17}WKA^{20}$) de CADY ont été échangés par les quatre ($K^{17}RKV^{20}$) de la séquence de MPG-ΔNLS ajoutant un caractère plus hydrophile sur la région C-terminale du peptide. Finalement, pour garder le même nombre de résidus aromatiques que dans la séquence de CADY, un tryptophane est positionné dans la zone initiatrice d'hélice (entre L^{10} et R^{11}). Ainsi, les quatre tryptophanes sont régulièrement espacés par trois acides aminés tout au long de la séquence de PG9.

Figure 3.3 : Représentation des analogues de CADY par projection *« Helical Wheel »* et par modélisation « *I-Tasser* ». La séquence primaire des analogues de CADY a été projetée en « *Helical Wheel* » et modélisée par « *I-Tasser* » pour **(A)** PSF1, PSF2 et PSF3 (la flèche rouge indique le sens de remplacement des W par F), **(B)** pour PSW, **(C)** pour PG16 (1) et (2) et **(D)** pour PG9**.** Le logiciel « *I-Tasser* » proposant plusieurs modèles pour un même peptide, les modèles retenus sont ceux énergétiquement stabilisés et correspondants aux meilleurs « C-*scores* » : modèles 1 pour les PSF, PSW, PG9 et modèles 1 et 2 pour PG16. Code couleur : vert clair = zone riche en leucine, vert foncé = zone riche en tryptophane et violet = zone riche en arginine.


A
PSF1
PSF2
PSF3
B
PSW
C
PG16(1)
PG16(2)
D
PG9

2.3. Caractérisation *in silico* des analogues de CADY

Dans un premier temps, nous avons vérifié la capacité des analogues de CADY à se structurer en hélice et à dégager les zones fonctionnelles caractéristiques de CADY. Pour cela les séquences primaires des analogues ont été projetées sur des hélices à l'aide du logiciel « *Helical Wheel* » puis, pour une comparaison plus précise, des structures 3D des mutants ont été générées avec le logiciel « *I-Tasser* » (Figure 3.3).

Les projections obtenues par *« Helical Wheel »* (Figure 3.3 (A-C)) montrent que tous les analogues ont une répartition des trois zones fonctionnelles similaires à celle de CADY. Seul PG9 (Figure 3.3 (D)) ne partage pas cette caractéristique. En effet la projection montre que la zone occupée par les tryptophanes chevauche celle occupée par les résidus arginines.

En parallèle, les modèles produits par « *I-Tasser* » indiquent que les structures 3D adoptées par les différents mutants sont uniquement des hélices alpha. Ces structures hélicoïdales sont cependant stabilisées par des interactions intramoléculaires différentes.

Les structures des peptides de la famille **PSF** présentent la même répartition des zones fonctionnelles que CADY, cependant la présence du résidu phénylalanine modifie les interactions en π-*stacking* et en π-cation impliquant les résidus tryptophanes (Figure 3.3 (A)). De plus les modèles de PSF1, PSF2 et PSF3 montrent que le résidu phénylalanine ne participe pas à ce type d'interaction quelle que soit sa position. Plus précisément, on observe que:

- PSF1 comporte trois interactions π-cation dont l'une stabilise deux tryptophanes simultanément : $W^{7}\rightarrow R^{11}$; $W^{14}\rightarrow R^{11}$; $W^{18}\rightarrow K^{20}$.
- PSF2 comporte deux interactions π-cation : $W^{14}\rightarrow R^{11}$; $W^{18}\rightarrow K^{20}$.
- PSF3 comporte deux interactions π-cation : $W^{7}\rightarrow R^{11}$;$W^{18}\rightarrow R^{15}$ et un π-*stacking* : $W^{3}\leftrightarrow W^{7}$.

Comparé à CADY dont le modèle implique deux interactions de type π-*cation* ($W^3 \rightarrow R^4$ et $W^7 \rightarrow R^4$) et une de type π-*stacking* ($W^{14} \leftrightarrow W^{18}$), la stabilisation de la structure hélicoïdale de PSF1 et PSF2 comprend uniquement des interactions π-cation mais à des positions différentes. Par contre PSF3, comme CADY, contient deux interactions π-cation et un π-*stacking* mais sur des positions différentes.

Malgré un tryptophane manquant sur les composés PSF, on observe une redistribution des interactions stabilisantes qui maintiennent l'intégrité de l'hélice mais qui pourraient cependant influer sur le comportement des peptides en présence des différents partenaires.

Dans le cas de l'analogue **PSW**, l'ajout d'un résidu W à la position L^{10} n'apporte pas de changements notoires sur la séparation des zones fonctionnelles ni sur les interactions stabilisantes entre les arginines et les tryptophanes (Figure 3.3 (B)) qui sont identiques à celles observées dans la séquence de CADY (Figure 3.1). Donc, le tryptophane supplémentaire s'intègre parfaitement dans la zone riche en tryptophanes et l'agrandit sans impacter les interactions stabilisantes de l'hélice.

Pour **PG16**, la projection sur hélice indique une répartition des zones fonctionnelles identique à CADY. Le résidu glycine, se trouvant au milieu de la zone initiatrice d'hélice sur la séquence primaire, n'a pas d'impact sur les zones riches en arginines ou en tryptophanes car il est inclus dans la zone riche en leucines (Figure 3.3). Si comme pour les autres analogues, le modèle le plus stable énergétiquement (*C-score* = -0,11) est la structure en hélice alpha (Figure 3.3 (C1)) avec des interactions stabilisantes identiques à CADY, un deuxième modèle proposé par « *I-Tasser* » avec un score moins intéressant (C-score= -2,76) pourrait faire partie des conformations privilégiées pour PG16. C'est un modèle dont le fragment caractéristique R^8LLR^{11}, connu dans CADY pour initier l'hélice, ne serait pas structurée en hélice dans le cas de PG16 (Figure 3.3 (C2)). Cette différence est imputée à la présence de la glycine dans cette zone R^8**G**LR^{11}. Seuls les fragments N- et C-terminaux auraient la possibilité d'adopter une structure hélicoïdale avec des interactions π-cation ($W^3 \rightarrow R^4$, $W^7 \rightarrow R^8$, $W^{14} \rightarrow R^{15}$) et une interaction π-*stacking* ($W^{14} \leftrightarrow W^{18}$) stabilisant les deux hélices résiduelles.

Comme les autres analogues, la structure proposée pour **PG9** est une hélice alpha présentant les 3 zones fonctionnelles. Toutefois, le fragment C-terminal ne conserve

plus la formation hélicoïdale sur les derniers résidus, ce qui paraît logique étant donné la nature très hydrophile de ce domaine (Figure 3.3 (D)). La stabilité de l'hélice alpha de PG9 est maintenue uniquement avec des interactions π-cation sur les résidus : $W^{3}\rightarrow R^{4}$, $W^{7}\rightarrow R^{8}$, $W^{10}\rightarrow R^{8}$, $W^{15}\rightarrow R^{19}$.

L'analyse *in silico* de CADY et ses analogues montre que tous les peptides sont capables d'adopter une conformation hélicoïdale stabilisée par des interactions de type π-*stacking* et de type π-cation. Dans les prochains chapitres, nous allons analyser *in vitro* leur capacité à interagir avec un siRNA pour former des nanoparticules et les conséquences structurales de ces interactions.

3. Sélection des analogues pour la vectorisation de siRNA

CADY et ses analogues présentent de grandes similarités quant à leur structuration possible en hélice, la répartition de leurs résidus tout le long de cette hélice et les interactions la stabilisant. Cela laisse penser qu'ils auront des propriétés physico-chimiques proches.

3.1. Critères de solubilité des analogues de CADY

L'exploitation du potentiel de vectorisation des peptides passe par une synthèse de qualité et une facilité à les remettre en solution. Afin de déterminer leur solubilité, tous les peptides (ayant une masse molaire similaire) ont été solubilisés pour obtenir une concentration finale identique selon un protocole standardisé (cf. CHAPITRE 6, §1.1). Néanmoins pour certains analogues comme PSF1, PSF2 et PSW, on observe que les peptides ne sont pas complétement solubles dans l'eau puisque des culots sont visibles au fond des tubes après centrifugation. Cela se reflète dans les mesures analytiques montrant des concentrations 2 à 10 fois plus faibles que celles attendues. On peut donc observer différentes propriétés de solubilité allant de très soluble (+++ pour CADY, PG16 et PG9), soluble (++ pour PSF3) à peu soluble (+ pour PSF1, PSF2 et PSW) (Tableau 3.2).

Par ailleurs le coefficient d'hydrophobicité (GRAVY) calculé à partir de l'échelle développée par Kyte and Doolittle est un indice supplémentaire permettant de prévoir la solubilité de nos peptides. Plus ce coefficient est élevé et plus le peptide est hydrophobe, compromettant ainsi sa solubilité en milieu aqueux. Les coefficients pour nos peptides nous permettent de les classer selon une hydrophobicité théorique décroissante : PSF1~PSF2~PSF3>CADY>PG16>PSW>PG9.

Pour les peptides de la famille PSF les coefficients d'hydrophobicité correspondent au caractère peu soluble (+ ou ++) des peptides. Etonnamment, pour la séquence de PSW où le coefficient d'hydrophobicité est réduit par le remplacement d'une leucine par un tryptophane, la solubilité du peptide n'en est pas améliorée. En revanche, avec des coefficients d'hydrophobicité proche de 0, les peptides PG9 et PG16 ont une bonne solubilité.

Tableau 3.2 : Caractérisation des propriétés biochimiques de CADY et ses analogues.

Nom	Solubilité	Kd (nM)	Hydrophobicité (GRAVY)
CADY*	+++	47 ± 10	0,175
PSF1	+	466 ± 197	0,360
PSF2	+	477 ± 255	0,360
PSF3	++	> 1000	0,360
PSW	+	67 ± 43	-0,060
PG16	+++	131 ± 60	0,085
PG9	+++	77 ± 46	-0,395

Notes : Les peptides sont évalués en termes de solubilité (solubilisation de quantité de peptide, en mg, pour obtenir des concentrations équivalentes, suivi par une mesure d'absorbance à 280 nm au spectrophotomètre pour déterminer les concentrations finales), de leur coefficient d'hydrophobicité (calcul du *Grand Average of Hydropathy* ou GRAVY selon Kyte et Doolittle, 1982) ainsi que de leur affinité pour un siRNA (la constante d'affinité Kd est obtenue par spectroscopie de fluorescence à l'aide d'un siRNA-FITC, les détails du protocole sont présentés dans le CHAPITRE 6). + : peptide peu soluble, ++ : peptide soluble, +++ : peptide très soluble. * pour CADY : Kd publiée dans (153), la fonction cystéamide n'est pas incluse dans le calcul du coefficient d'hydrophobicité de CADY.

3.2. Mesure des constantes d'affinité par fluorescence

Dans la vectorisation non covalente, le prérequis indispensable pour un peptide vecteur est de pouvoir interagir avec sa cargaison. Cependant, si les affinités doivent être suffisamment fortes pour emmener la molécule vectorisée jusqu'à sa cible intracellulaire, celles-ci doivent néanmoins être assez labiles de façon à permettre le relargage *in cellulo.*

Afin de quantifier l'affinité de CADY et de ses analogues pour un siRNA, les constantes d'affinité (Kd) ont été mesurées par spectrométrie de fluorescence en dosant un siRNA fluorescent en fonction de concentrations croissantes de peptides (Tableau 3.2).

Les Kd des peptides de la famille PSF sont élevées, de l'ordre de 500 nM pour PSF1 et PSF2, et au-delà du micromolaire pour PSF3. Ces valeurs sont 10 à 20 fois plus élevées que pour CADY (47 ± 10 nM), indicatrices d'une faible affinité de ces peptides pour le siRNA. Les constantes d'affinité des peptides PSW, PG9 et PG16, Kd sont relativement proches de celle de CADY, avec des valeurs respectives de 67 ± 43 nM, 77 ± 46 nM et 131 ± 60 nM.

En vue de leur faible solubilité et affinité pour leur cargaison, les peptides PSF1, PSF2, et PSF3 n'ont pas été sélectionnés comme candidat potentiel dans le cadre de l'optimisation de la séquence de CADY. Pour les mêmes problèmes de solubilité, le peptide PSW n'est également pas retenu. En effet, la solubilité partielle d'un peptide vecteur pourrait induire par la suite des problèmes de reproductibilité au cours des expériences.

Les peptides **PG9** et **PG16** ont donc été choisis pour une étude plus approfondie, ils seront systématiquement comparés à CADY pour leurs interactions avec un siRNA ou des modèles de membranes lipidiques ainsi que pour leurs efficacités de transfection *in cellulo*.

4. Etude comparative entre PG9, PG16 et CADY

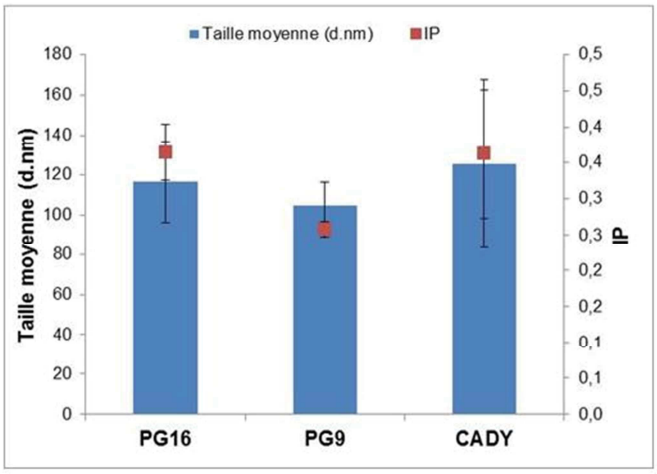
4.1. Analyse de la formation des complexes CPP/siRNA

4.1.1. Caractérisation des paramètres colloïdaux des complexes CPP/siRNA

L'estimation des paramètres colloïdaux des particules PG16/siRNA et PG9/siRNA va permettre de contrôler si leur formation est similaire à celle des particules CADY/siRNA. Les tailles moyennes mesurées pour les particules PG16/siRNA et PG9/siRNA sont de 116,6 ± 20,2 nm et 104,8 ± 11,1 nm avec des indices de polydispersité (IPs) respectivement de 0,365 ± 0,039 et 0,258 ± 0,011 (Figure 3.4 (A)). Ces valeurs sont proches de celles obtenues pour CADY complexé au siRNA (Taille moyenne de 125,3 ± 42,1 nm et IP de 0,362 ± 0,089).

Ensuite, afin de mesurer le potentiel zêta, ces mêmes complexes sont formulés dans de l'eau ultra pure contenant 5 mM de NaCl. En effet, la présence de sel permet de créer une double couche ionique autour de la particule, indispensable à la mesure de ce paramètre. Bien que légèrement augmentées en solution saline, les tailles moyennes des complexes restent dans le même ordre de grandeur que dans de l'eau pure (en particulier pour PG16 et PG9). Tandis que les charges de surface se distinguent en fonction du complexe étudié, le potentiel zêta qui est de 44,0 ± 1,4 mV pour CADY diminue pour PG16 à 34,9 ± 0,4 mV et pour PG9 à 29,8 ± 2,1 mV (Figure 3.4 (B)). Conformément à l'échelle définie par DAH et coll. (cf. CHAPITRE6, § 6.2), avec des valeurs de PZ comprises entre +40 mv et +30 mV, les complexes de PG9 et PG16 sont dans une zone de stabilité modérée. Tandis que les complexes de CADY, avec une valeur au-dessus de 40 mV, sont dans une zone de bonne stabilité (233). Par la suite, on constate que paradoxalement au fait que PG9 possède le nombre de charges positives le plus important dans sa séquence primaire (8 au total), il présente la charge de surface la plus faible. Ces différences impliquent que les particules formées par CADY, PG16 ou PG9 n'exposent pas les zones hydrophiles chargées et les zones hydrophobes de la même manière en surface du complexe CPP/siRNA (cf. § 3).

A



B

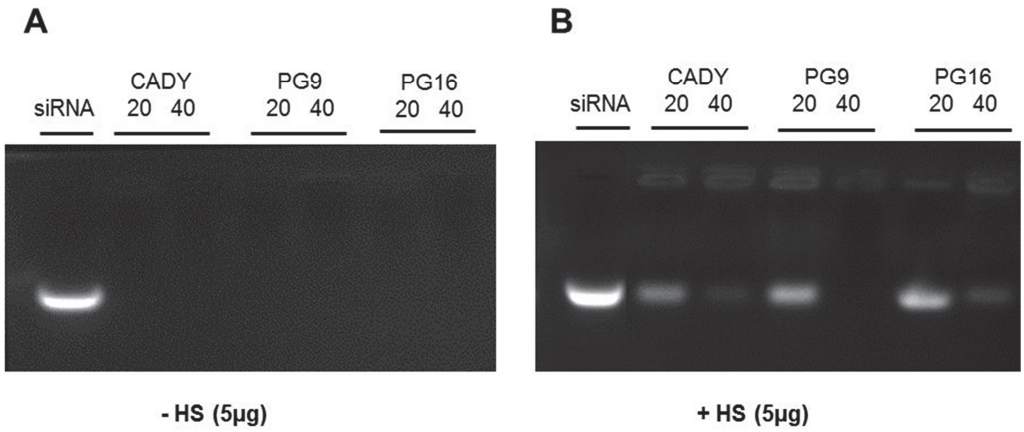
	Taille moyenne (d.nm)	IP	PZ (mV)
PG16	155,2 ± 30,7	0,344 ± 0,129	34,9 ± 0,4
PG9	160,4 ± 14,0	0,252 ± 0,008	29,8 ± 2,1
CADY	117,7 ± 3,5	0,282 ± 0,060	44,0 ± 1,4

Figure 3.4 : Mesures des paramètres colloïdaux des trois complexes CADY/siRNA, PG16/siRNA et PG9/siRNA. (A) La taille moyenne et l'IP sont estimés dans l'eau ultra pure. **(B)** La taille moyenne, l'IP et la charge de surface des particules représentée par le potentiel zêta (PZ) sont estimés dans une solution aqueuse contenant 5 mM de NaCl. Tous les complexes sont formés à un ratio molaire R=40 avec une concentration en peptide de 25 µM.

4.1.2. Evaluation de la stabilité des complexes CPP/siRNA

Les premiers résultats ont montré que les trois CPPs CADY, PG16 et PG9 ont une forte affinité pour le siRNA avec lequel ils sont capables de former des particules chargées positivement. Dans ce chapitre, nous allons analyser la stabilité des complexes en présence d'héparane sulfate (HS). Les héparanes sulfates sont des polysaccharides linéaires que l'on trouve en abondance dans le milieu extracellulaire et leur utilisation nous permet de mimer cet environnement. Les HS sont chargés négativement – ce qui les met en compétition directe avec le siRNA pour interagir avec le peptide.

Afin d'évaluer la stabilité des complexes CPP/siRNA, ces derniers sont incubés en absence ou en présence d'HS puis le relargage du siRNA est observé par un essai de migration par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3.5).



C

		CADY	PG9	PG16
	siRNA	R=20		
% Intensité	100	25,0 ± 1,4	37,7 ± 1,0	36,8 ± 16,3
		R=40		
% Intensité	100	10,1 ± 4,4	0,0 ± 0,0	11,8 ± 0,2

Figure 3.5 : Evaluation de la formation et de la stabilité des particules CPP/siRNA par électrophorèse sur gel d'agarose. Les complexes sont formés avec une concentration fixe de siRNA (0,33 pmol) à deux ratios molaires R=20 et 40 dans une solution aqueuse à 5% de glucose. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%), contenant un intercalant d'oligonucléotide, le GelRed®. Le siRNA libre de migrer dans le gel est révélé par des rayons UV par le marquage avec le GelRed. Les complexes CADY/siRNA sont comparés à ceux formés avec PG9 et PG16 en absence de traitement (**A**) et suite à une incubation de 30 minutes avec 5 µg d'héparane sulfate (HS) (**B**). L'intensité des bandes de siRNA libre en présence d'HS a ensuite été quantifiée grâce au logiciel Image J et rapportée à celle du siRNA non complexé (**C**).

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode standard qui permet d'évaluer la complexation des CPP/siRNA. Le siRNA libre est capable de migrer dans le gel d'agarose (Figure 3.5, bande de gauche) tandis que les nanoparticules sont retenues dans les puits du gel. Dans le cas des complexes CADY/siRNA, PG9/siRNA et PG16/siRNA, on observe la disparition de la bande de siRNA quel que soit le ratio utilisé (Figure 3.5 (A)). Par contre, lorsqu'on ajoute HS, on récupère pour les trois

CPPs un signal important de siRNA montrant le passage d'une forme complexée à une forme libre de celui-ci (Figure 3.5 (B)). Toutefois les signaux sont moins intenses que celui de la bande du siRNA seul. L'héparane sulfate entraîne donc une dissociation partielle des complexes qui semble dépendante du ratio molaire CPP/siRNA, les bandes ayant une intensité plus faible à R=40. Quantitativement parlant, la bande de siRNA libre pour CADY est moins intense, il protège donc mieux le siRNA que PG9 et PG16 pour leurs ratios 20/1. Au ratio 40/1, PG9 semble en revanche former des complexes plus stables avec le siRNA puisqu'aucune bande n'est détectée après ajout d'HS. Si les complexes formés avec CADY et PG16 semblent plus sensibles à la présence d'HS, l'intensité des bandes reste tout de même assez faible (environ 10-12%) (Figure 3.5 (C)).

4.2. Versatilité structurale de PG9 et PG16 en comparaison avec CADY

La versatilité structurale des CPPs, c'est à dire leur capacité à moduler leur structure en adoptant une structure secondaire particulière, est un facteur essentiel pour le mécanisme d'internalisation des peptides amphipathiques. En effet, une étude comparative sur les CPPs les plus décrits dans la littérature (ex. Tat, EB1, TP10, MAP etc.) a mis en avant cette particularité, réussissant à corréler de manière très précise la versatilité conformationnelle des peptides étudiés avec leurs mécanismes d'interaction (avec les membranes cellulaires). Ainsi les CPPs ayant un polymorphisme prononcé, c'est-à-dire n'adoptant pas de conformation particulière, n'entrent que par endocytose dans les cellules. En revanche, ceux qui possèdent une versatilité structurale, passage d'une structure désordonnée à une structure en hélice alpha ou feuillet bêta, peuvent à la fois être internalisés par les voies d'endocytose mais aussi par des mécanismes de translocation directe (204). Cet aspect est particulièrement bien décrit pour CADY et relève l'importance des interactions peptide/lipide (153,234). C'est pourquoi, en comparaison avec CADY, une analyse des structures secondaires de ses analogues PG9 et PG16 a été menée dans différents environnements pour évaluer l'influence de l'état structural du vecteur sur sa capacité à traverser la membrane plasmique.

4.2.1. Structure secondaire des CPPs seuls

Dans un premier temps, il a paru important de vérifier par mesure de dichroïsme circulaire (CD) si les CPPs étudiés étaient capables d'adopter une structure secondaire lorsqu'ils se trouvent seuls en solution (Figure 3.6).

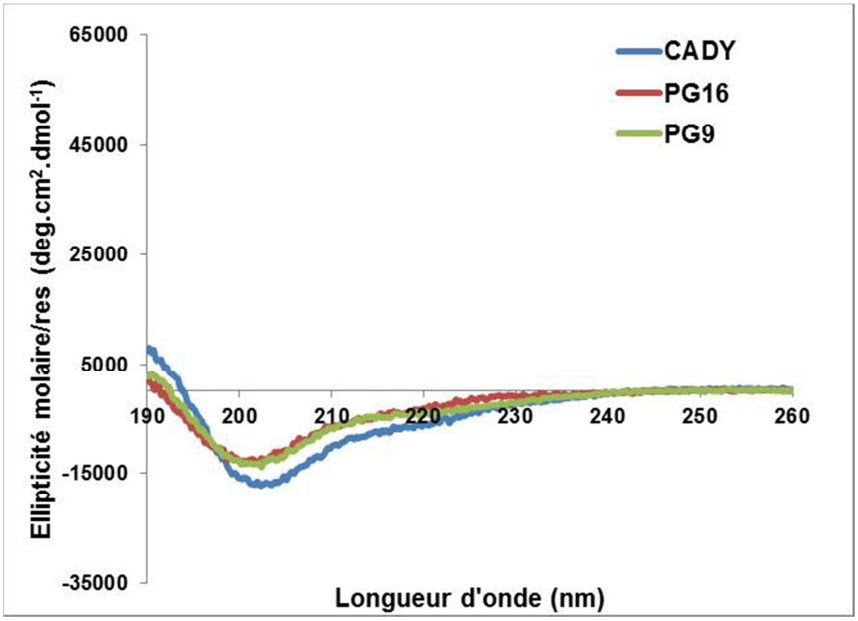


Figure 3.6 : Détermination des structures secondaires des peptides CADY, PG16 et PG9 seuls en solution. Les spectres de dichroïsme circulaire sont mesurés dans l'UV-lointain, dans de l'eau ultra pure, avec une concentration de peptide de 40 µM.

Les spectres des peptides en solution dans de l'eau ultra pure présentent des minimas autour 202 nm pour PG16 et PG9 et à 203 nm pour CADY comme précédemment montré (153). L'allure de ces spectres est proche du spectre d'une conformation non structurée dite « *random-coil* » (structure désordonnée) pour lequel on observe typiquement un minima unique à 198 nm et des valeurs d'ellipticité molaire négatives à 190 nm (235,236).

Les petits décalages observés à 190 nm suggèrent que le caractère « *random-coil* » est légèrement plus prononcé pour PG16 et PG9 que pour CADY.

Ensuite, la structure secondaire a été déterminée en présence de lipides représentatifs de la membrane plasmique. Il s'agit d'un mélange de lipides à tête

polaire phosphatidylcholine neutre (DOPC et SM) et de cholestérol, agencés sous forme de liposomes. En présence de lipides, nous observons des modifications conformationnelles plus ou moins significatives des peptides à différents ratios molaires lipide/peptide (r) (Figure 3.7).

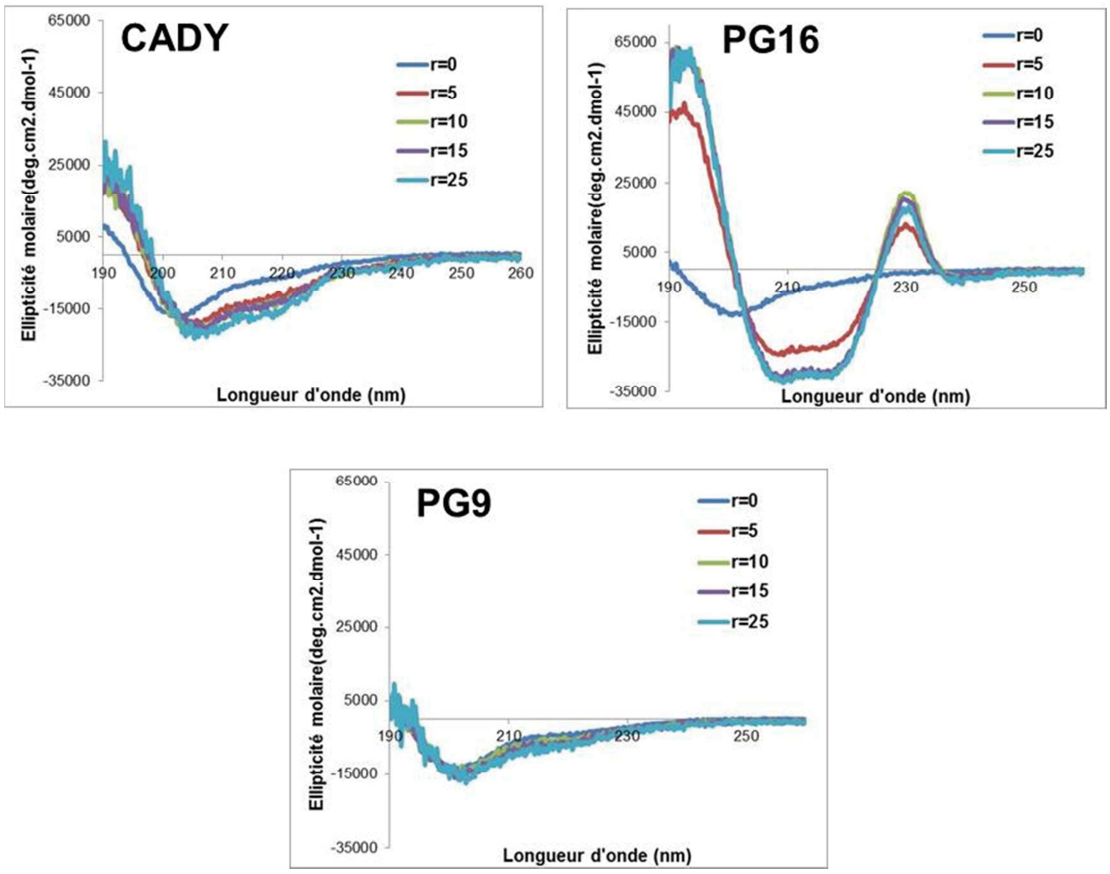


Figure 3.7 : Détermination des structures secondaires des peptides seuls et en présence de LUV de DOPC/SM/chol (40/40/20). Les spectres de dichroïsme circulaire sont mesurés dans l'UV-lointain dans de l'eau ultra pure à différents ratios molaires lipides/peptides r=5/1, 10/1, 15/1 et 25/1 avec une concentration fixe de peptide à 40 µM.

CADY : La concentration croissante de lipides modifie légèrement le spectre de CADY pour laisser apparaître, au ratio molaire le plus élevé (r=25), un maximum à 195 nm et deux minima autour de 207 nm et 222 nm. On passe donc d'une structure « *random-coil* » à une conformation plus ordonnée caractéristique d'une structure hélicoïdale. Cependant, l'amplitude faible du spectre indique que le changement reste limité et que l'hélice n'est pas majoritaire en solution. Ce résultat confirme les

résultats *in silico* obtenus avec CADY dans un environnement DOPC (neutre) *versus* DOPG (anionique) : on observe une structuration en hélice plus limitée en DOPC qu'en DOPG car il n'y a pas de contributions électrostatiques (153).

PG16: Les liposomes entrainent un changement conformationnel rapide de PG16, dès les premiers ratios molaires (r=5/1). On observe un changement franc de l'allure du spectre comparé à celui du peptide seul caractéristique d'une structuration en hélice avec un maximum de grandes amplitudes (195 nm) et deux minima (207 nm et 222 nm). Du reste l'ajout de lipides renforce et stabilise cette conformation hélicoïdale, car les spectres obtenus aux ratios molaires plus élevés (10/1, 15/1 et 25/1) se superposent. En plus des pics caractéristiques d'une structure en hélice, un maximum supplémentaire se dégage à 230 nm pour tous les ratios étudiés, il est souvent représentatif d'une implication des résidus tryptophanes sur la structure au moment de l'interaction avec les phospholipides.

PG9: Les spectres obtenus en présence de lipides sont identiques à celui du peptide seul en solution. Les lipides n'induisent donc pas de changement conformationnel de PG9 puisque quel que soit le ratio molaire utilisé, ce dernier conserve sa caractéristique « *random-coil* ».

Pour conclure, dans cet environnement lipidique, seuls PG16 et CADY présentent une versatilité structurale. Le phénomène est assez faible pour CADY mais se révèle dominant dans le cas du peptide PG16. Alors que PG9 affiche plutôt un polymorphisme important puisqu'il n'adopte pas de conformations spécifiques qu'il soit seul ou en présence de lipides.

4.2.2. Structure secondaire des complexes CPP/siRNA

Après avoir analysé la structure secondaire des CPPs seuls ou en présence de lipides, nous nous sommes intéressés à la structure secondaire des peptides sous forme complexée au siRNA. De la même manière, les complexes ont été mesurés en milieu aqueux seul puis en présence de liposomes (Figure 3.8).

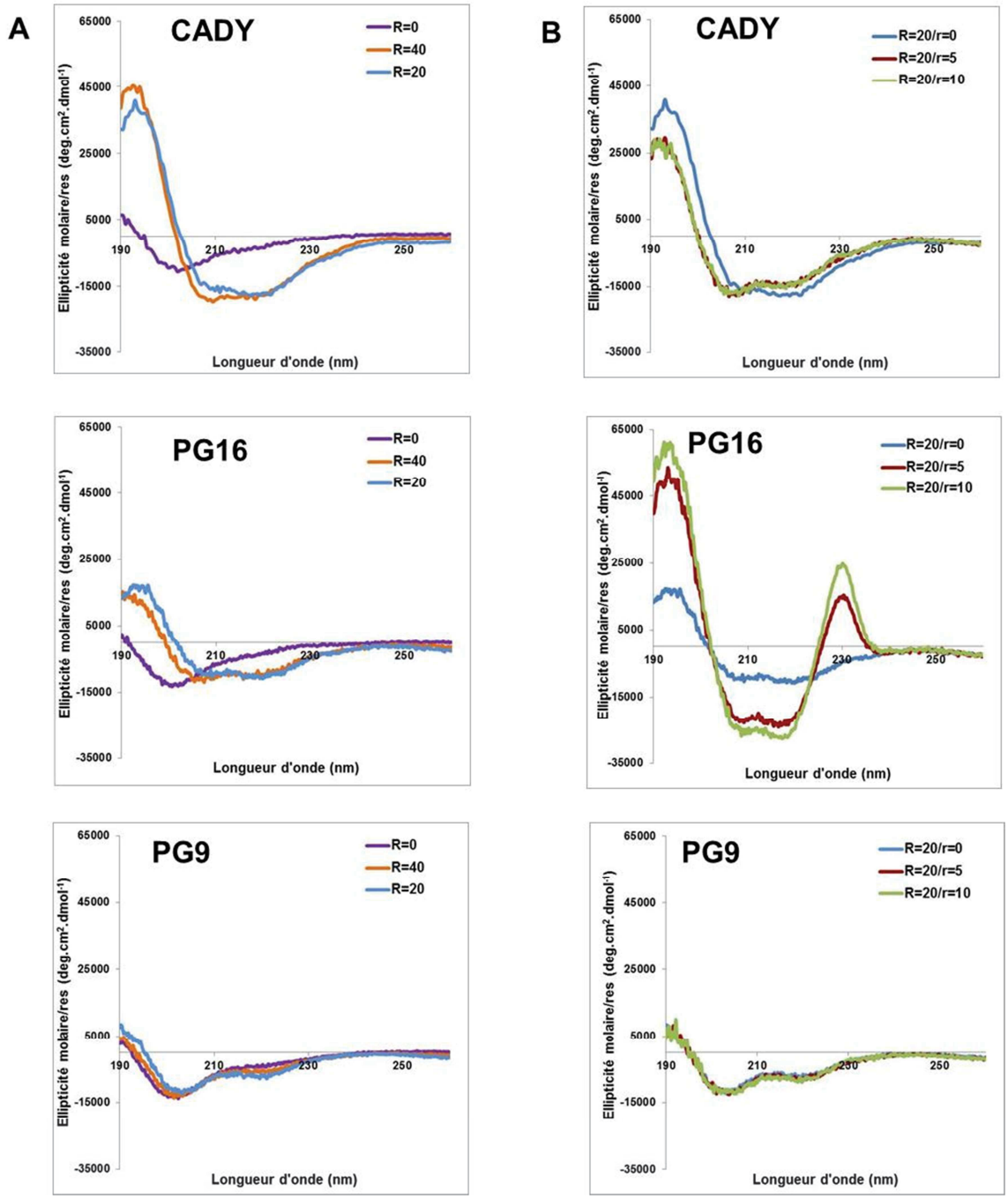


Figure 3.8 : Détermination des structures secondaires des complexes CADY/siRNA, PG16/siRNA et PG9/siRNA seuls et en présence de LUV de DOPC/SM/chol (40/40/20). Les spectres de Dichroïsme Circulaire sont mesurés dans l'UV-lointain dans de l'eau ultra pure. Les différents ratios molaires peptides/siRNA (R=40 et R=20) (**A**) et lipides/peptides (r=5/1 et r=10/1) (**B**) sont obtenus en ajoutant successivement sur le peptide (40 µM), les quantités nécessaires de siRNA, puis de lipides.

On observe pour les trois peptides CADY, PG16 et PG9 un changement conformationnel lorsqu'ils sont complexés au siRNA, indiquant le passage d'une

structure désordonnée à une structure hélicoïdale associé à l'apparition de minima à 207 nm et 222 nm (Figure 3.8 (A)). L'effet est moins prononcé pour PG9 pour lequel le spectre ne présente pas de maximum à 195 nm ni d'amplitude importante. De même pour PG16, où l'amplitude des trois extrema spécifiques d'une hélice reste faible.

D'autre part, les spectres de ces deux peptides n'évoluent pas en augmentant le ratio molaire de R=20 à R=40. En présence de siRNA, les spectres de CADY montrent une stabilisation de la conformation en hélice lorsque l'on augmente le ratio molaire. A un ratio molaire de R=40 et de R=20, les extrema sont bien définis avec des amplitudes importantes.

Ensuite les trois types de complexes CADY/siRNA, PG16/siRNA et PG9/siRNA sont mis en présence de LUV de DOPC/SM/chol aux ratios molaires complexes/lipides de 5/1 et de 10/1 (Figure 3.8 (B)). Les spectres de PG9/siRNA, en présence ou non de lipides, ne montrent aucune variation liée au ratio molaire. Ceux-ci se superposent, confirmant que les lipides n'induisent pas de changement structural supplémentaire du peptide PG9 en complexe. Des résultats similaires sont observés pour CADY, où les pics caractéristiques d'une structure hélicoïdale, à 207 nm et 222 nm, sont conservés à des amplitudes similaires de ceux des spectres obtenus en absence de lipides.

En revanche, l'addition de lipides aux complexes PG16/siRNA change complètement l'allure du spectre comparé à celui obtenu pour le complexe seul. La structure hélicoïdale est conservée mais avec une amplitude beaucoup plus importante, assez similaire aux spectres enregistrés pour le peptide seul en présence de lipides (Figure 3.8). Ceci suggère que les complexes PG16/siRNA interagissent fortement avec les lipides ou tout simplement que les complexes se dissocient pour laisser place à des interactions PG16/lipides ayant des affinités plus élevées que les interactions PG16/siRNA.

4.3. Affinité des CPPs pour les lipides – modèle de la monocouche lipidique

L'évaluation du mécanisme d'internalisation des peptides vecteurs est une étape essentielle dans l'optimisation du transport intracellulaire de molécules thérapeutiques. En fonction du type cellulaire, du CPP choisi et de la cargaison utilisée, on distingue deux mécanismes d'internalisation : une interaction directe avec la membrane plasmique ou l'activation des mécanismes d'endocytose (185,225,237). Par conséquent, la compréhension des interactions peptide/lipides devient primordiale dans l'évaluation du mécanisme d'internalisation. Nous avons choisi d'explorer cet aspect avec les techniques de Langmuir qui sont un moyen d'évaluer le comportement des peptides dans une situation interfaciale en présence ou non d'une monocouche de phospholipides. La bicouche lipidique de la membrane plasmique peut être représentée par une monocouche car il existe une relation thermodynamique directe entre les monocouches et les bicouches. De plus, ce modèle est plus facilement modulable et contrôlable en termes de composition et d'empaquetage des lipides (238).

Dans les deux cas, les résultats obtenus pour PG16 et PG9 seront comparés à CADY pour lequel une internalisation par interaction directe avec la membrane plasmique a déjà été suggérée (153).

4.3.1. Estimation du caractère amphipathique des CPPs

La formation de monocouches de Langmuir, couche constituée d'une seule assise de molécules, permet d'obtenir des détails au niveau moléculaire mais aussi des indications précises sur les caractéristiques biophysiques des molécules étudiées par exemple sur le caractère amphipathique des peptides vecteurs. Cette caractéristique est déterminée en ajoutant de petites quantités de peptide sous l'interface eau/air et en observant sa capacité à s'adsorber à cette interface (Figure 3.9). Ce test d'adsorption donne aussi des informations sur les interactions possibles avec la membrane plasmique pouvant être considérée schématiquement comme une interface hydrophile/hydrophobe (interface eau/air).

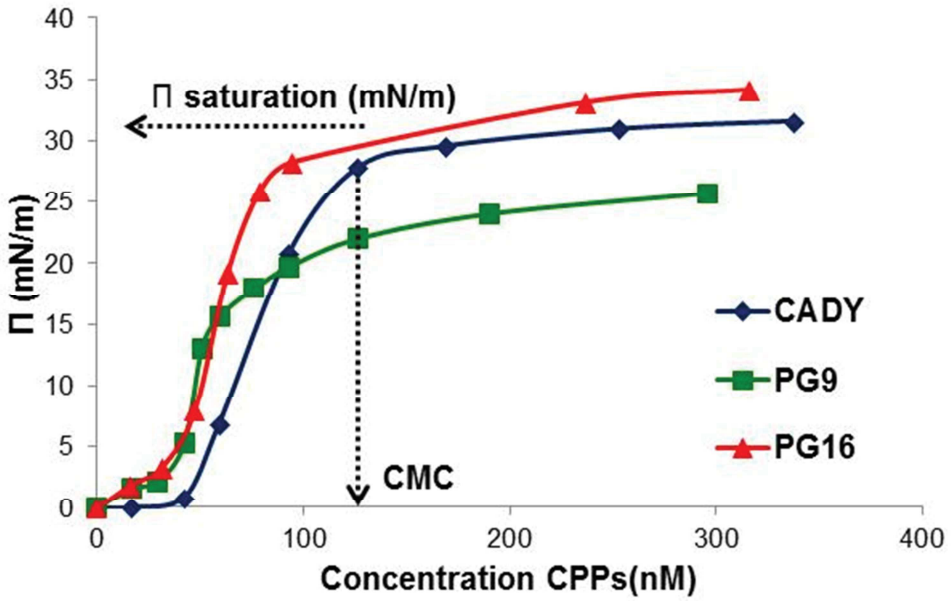


Figure 3.9 : Détermination du caractère amphipathique des peptides CADY, PG16 et PG9. Les variations de pression à une interface eau/air, lorsque l'on augmente les concentrations de peptides dans la sous-phase de la cuve de Langmuir (solution aqueuse avec 0,154 M NaCl), se stabilisent à une concentration micellaire critique (CMC) et à une pression de saturation spécifique (Π saturation – mN/m) à chaque peptide.

L'ajout de quantités croissantes de peptides à l'interface eau/air conduit à une stabilisation de la pression de saturation à 33 mN/m pour PG16, à 30 mN/m pour CADY et à 23 mN/m pour PG9 (Figure 3.9). Ces valeurs correspondent à la concentration spécifique de chaque CPP à laquelle, il n'est plus possible de placer de molécules supplémentaires à l'interface eau/air : c'est ce qu'on nomme la concentration micellaire critique (CMC). CADY et PG16 saturent l'interface à des pressions similaires (entre 30-35 mN/m). Cependant, cela se produit à une concentration de peptide plus faible pour PG16 (90 nM), comparé à CADY (130 nM). PG9 montre quant à lui une plus faible pression de saturation (~ 25 mN/m) ainsi qu'une très faible CMC, d'environ 60 nM.

Puisque les changements de pression superficielle (Π) enregistrés à l'interface eau/air en fonction de la concentration en peptide entrainent généralement un phénomène de saturation proportionnel à la propriété amphipathique du peptide, nous pouvons classer les peptides selon leur caractère amphipatique décroissant : PG16>CADY>PG9.

4.3.2. Insertion des CPPs dans des monocouches lipidiques

Pour examiner de manière plus précise les interactions entre les CPPs et les lipides, la capacité des peptides à interagir et s'insérer dans des monocouches lipidiques de différentes natures a été évaluée en effectuant des tests d'insertion (Figure 3.10).

Les tests d'insertion ont été réalisés en présence de deux types de monocouche, d'états physiques et de charges différents. Comme dans les expérimentations précédentes évaluant le polymorphisme structural (cf. CHAPITRE 3, § 4.2.1. et 4.2.2.), une monocouche composée de DOPC/SM/Chol est prise comme référence pour mimer la membrane plasmique. Son pourcentage de cholestérol (Chol) et de sphingomyéline (SM) à doubles chaines alkyles saturées lui confère une certaine rigidité, la classant dans la catégorie des phases liquides condensés (LC). De plus, les têtes polaires zwitterioniques choline des DOPC et SM lui attribuent une charge nette neutre.

En revanche, la deuxième monocouche utilisée est composée uniquement de DOPG ce qui conduit à une monocouche avec des caractéristiques différentes : les têtes polaires sont chargées négativement, et l'état physique est la phase liquide expansée (LE).

L'insertion des peptides CADY, PG16 et PG9 dans les monocouches lipidiques a été effectuée en injectant des quantités de peptides proches mais inférieures à la CMC dans la sous phase des différentes monocouches. Ensuite, les variations de pression, $\Delta\Pi$, sont enregistrées à partir des pressions initiales (Πi) des monocouches adsorbées à l'interface. Les variations de pression ($\Delta\Pi$) sont ensuite reportées pour chaque pression initiale (Πi) dans les graphiques selon la fonction $\Delta\Pi = f(\Pi i)$. L'extrapolation de ces résultats sur l'axe représentant la pression initiale permet d'extraire la pression maximum d'insertion (MIP pour *maximum insertion pressure*) qui correspond à la pression à laquelle l'interaction/insertion des peptides avec les lipides est énergétiquement favorable. La MIP est schématiquement la pression à partir de laquelle plus aucune insertion de peptide n'est possible dans la monocouche.

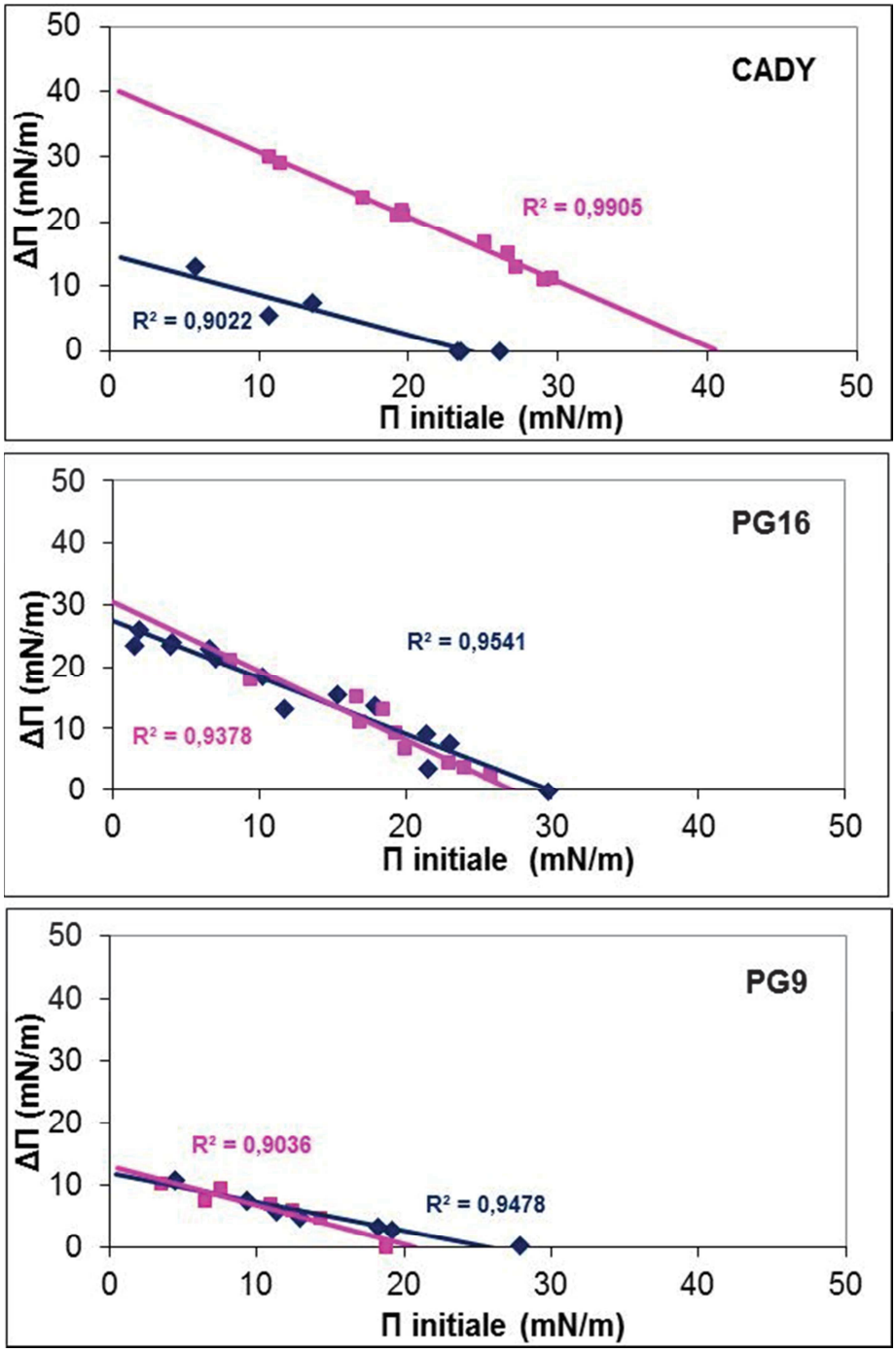


Figure 3.10 : Insertion des peptides CADY, PG16 et PG9 dans une monocouche de DOPG (rose) ou de DOPC/SM/chol (bleu). La variation de pression de surface ΛΠ (mN/m) due à l'insertion du peptide est mesurée pour des monocouches de lipides de pressions initiales différentes (Π initiale). Ces pressions initiales sont obtenues après adsorption des lipides à l'interface eau/air.

Pour la monocouche de DOPG, les valeurs des MIP correspondent approximativement à 40 mN/m pour CADY, 28 mN/m pour PG16 et 20 mN/m pour PG9 (Figure 3.10). Cependant, pour la monocouche de DOPC/SM/Chol, les MIP sont autour de 24 mN/m pour CADY, 30 mN/m pour PG16, et 26 mN/m pour PG9.

La pression latérale d'une membrane biologique est référencée autour de 30-35 mN/m (239). Il est admis qu'un peptide peut s'insérer de manière spontanée dans une membrane biologique si son MIP est supérieur ou égal à la pression latérale des membranes biologiques (238,240,241). Ainsi PG9 ne semble pas pouvoir s'insérer dans une membrane de phospholipides quel que soit son état physique ou sa charge. CADY s'insère préférentiellement dans des membranes chargées et PG16 dans des membranes non chargées dans un état physique LC.

L'extrapolation des résultats sur l'axe des variations de pression c'est-à-dire à pression initiale nulle, $\Delta\Pi = f(\Pi i = 0)$, permet d'obtenir une valeur de pression qui devrait coïncider avec les pressions de saturation, Πsat, obtenues pour les peptides seuls. On distingue alors 3 possibilités :

- $[\Delta\Pi = f(\Pi i = 0)] = \Pi sat$: la variation de pression à pression initiale nulle est similaire à la pression de saturation du peptide en l'absence de lipides, indiquant des interactions possibles entre le peptide et les lipides.
- $[\Delta\Pi = f(\Pi i = 0)] > \Pi sat$: la variation de pression à pression initiale nulle est supérieure à la pression de saturation du peptide en l'absence de lipides, indiquant des interactions favorables entre le peptide et les lipides.
- $[\Delta\Pi = f(\Pi i = 0)] < \Pi sat$: la variation de pression à pression initiale nulle est inférieure à la pression de saturation du peptide en l'absence de lipides, indiquant des interactions défavorables entre le peptide et les lipides.

Pour la monocouche de DOPG, les variations de pression extrapolées pour les pressions initiales nulles ($\Pi i = 0$) obtenues correspondent approximativement à 40 mN/m pour CADY, 31 mN/m pour PG16, et 13 mN/m pour PG9 (Figure 3.10). Cependant, pour la monocouche de DOPC/SM/Chol, les valeurs extrapolées à $\Pi i = 0$ sont autour de 15 mN/m pour CADY, 28 mN/m pour PG16 et 12 mN/m pour PG9 (Figure 3.10).

De ces résultats, nous pouvons conclure que :

- CADY en monocouche de DOPG : [ΔΠ = f(Πi = 0)] **>** Πsat = 30 mN/m indiquant des interactions peptide/lipide très favorables.
- CADY en monocouche de DOPC/SM/Chol : [ΔΠ = f(Πi = 0)] **<** Πsat = 30 mN/m indiquant des interactions peptide/lipide très défavorables.
- PG16 en monocouche de DOPG et DOPC/SM/Chol : [ΔΠ = f(Πi = 0)] ~ Πsat = 33 mN/m, indiquant que PG16 est capable d'interagir avec des lipides neutres et chargés.
- PG9 en monocouche de DOPG et DOPC/SM/Chol : [ΔΠ = f(Πi = 0)] **<** Πsat = 23 mN/m, indiquant des interactions défavorables entre les deux types de monocouches lipidiques et le peptide.

5. Evaluation de l'efficacité de transfection *in cellulo*

L'évaluation des caractéristiques biophysiques de PG16 et PG9, comparés à CADY, fait état de peptides capables d'adopter une structure en hélice α en fonction de leur partenaire, et de former des nanoparticules avec un siRNA. Cependant, des différences remarquables se profilent en particulier sur les interactions possibles avec les lipides. Sachant que les lipides sont les principaux composants des membranes biologiques, des différences d'affinité pour les lipides peuvent potentiellement induire des variations dans le mécanisme d'internalisation et donc dans l'efficacité de transfert de siRNA. Afin d'évaluer et comparer les trois vecteurs, nous avons donc analysé leur efficacité à délivrer des siRNAs *in cellulo* ainsi que leur cytotoxicité (Figure 3.11).

Pour cela, nous utilisons des cellules de mélanome murin B16 transfectées de manière stable avec un plasmide codant pour le gène de la luciférase (B16-Luc+). La luciférase est utilisée en biologie moléculaire en tant que gène rapporteur. Cet enzyme a la particularité d'oxyder la luciférine (substrat) aboutissant à la formation d'oxyluciférine et à une émission de photons mesurable à l'aide d'un luminomètre. Ce modèle cellulaire est aujourd'hui utilisé en routine pour cribler la capacité de différents vecteurs à transférer des siRNAs dans les cellules. Ainsi, une atténuation d'émission de photons suite à la transfection est donc directement liée à une

inhibition de la synthèse de luciférase et par conséquent à une efficacité de transfection élevée.

Afin de comparer l'efficacité des nanoparticules à transfecter les cellules B16-Luc+, nous avons incubé celles-ci avec les trois types de complexes à un ratio R=20 contenant différentes concentrations de siRNA-Luc (1 nM, 5 nM et 20 nM) (Figure 3.11). Les complexes CADY/siRNA-Luc montrent une efficacité dose-dépendante sur la répression de l'activité de la luciférase allant jusque 50% de « *knock-down* » pour la concentration de siRNA la plus élevée (20 nM). De plus, cette diminution d'activité luciférase n'est associée à aucune cytotoxicité, les valeurs de toxicité obtenues étant équivalentes à celles des cellules non-traitées.

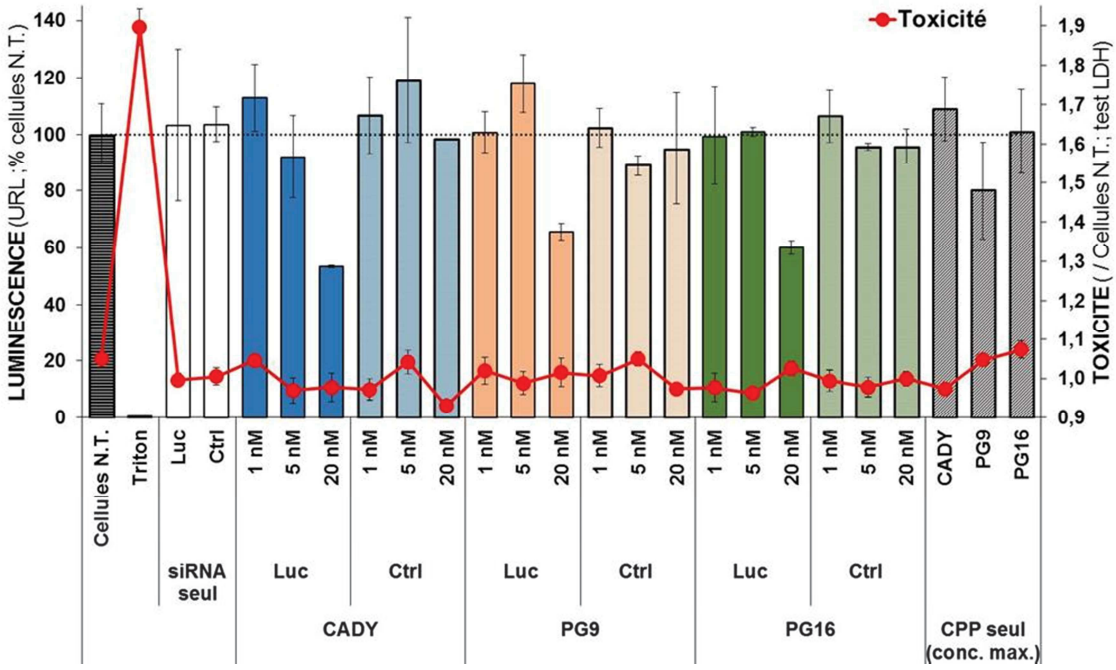


Figure 3.11 : Evaluation de l'efficacité de transfection et de la toxicité des nanoparticules CADY/siRNA, PG9/siRNA et PG16/siRNA. Les complexes sont testés à différentes concentrations de siRNA-Luc (1, 5 et 20 nM) sur des cellules de mélanome murin B16-Luc+ à un ratio molaire R=20. Pour chaque condition, l'activité de la luciférase est déterminée par luminométrie et la toxicité est mesurée à l'aide d'un kit LDH. Le graphique représente la moyenne et les écart-types de trois mesures indépendantes (n=3). Comme contrôles de transfection sont représentés les cellules non-traitées (N.T.), les cellules incubées avec les siRNA et les CPPs seuls et comme contrôle de la toxicité les cellules incubées avec du Triton.

En comparaison avec les nanoparticules CADY/siRNA-Luc, les complexes PG9/siRNA-Luc et PG16/siRNA-Luc ont tendance à induire une plus faible inhibition de l'expression de la luciférase (~40% à 20 nM de siRNA-Luc). Cependant, ces effets semblent spécifiques, car toutes les conditions contrôles utilisées (siRNA-Luc et CPPs seuls ou CPP/siRNA-Ctrl) n'induisent pas de « *knock down* » de la luciférase. De plus, la diminution d'activité luciférase induite par les trois nanoparticules n'est associée à aucune cytotoxicité, les valeurs de toxicité obtenues étant équivalentes à celles des cellules non-traitées.

6. Conclusions

Parmi les six vecteurs analogues de CADY développés au sein de notre équipe, nous avons sélectionné PG16 et PG9 comme candidats pouvant avoir de meilleures propriétés biophysiques et biologiques que CADY. Les travaux réalisés comparant ces deux vecteurs à CADY en termes de structure secondaire, d'interaction avec différentes entités, de formation de nanoparticules et d'activité biologique ont montré certaines similitudes entre les peptides mais aussi des différences significatives. Les résultats majeurs ont été regroupés dans le Tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Récapitulatif des résultats obtenus pour CADY, PG16 et PG9.

Analyses	CADY	PG16	PG9
« Helix Wheel »	3 zones ordonnées	similaire à CADY	désordonné
I-Tasser	αH	+/- αH	αH
Interaction siRNA	+	+	+
Taille NP*	~ 125	~ 117	~ 105
Charge NP (mV)	~ 44	~ 35	~ 30
Interaction HS	+	+	+/-
Interaction LUV	+	++	+/-
Amphipaticité	+	++	-
Insertion lipidique	+	++	-
Toxicité	-	-	+
Activité *in cellulo*	++	-	+/-

Notes : αH : Hélice alpha. *Taille moyenne mesurée dans l'eau en (diamètre.nm). NP=nanoparticule. La charge des NP est exprimée en mV.

Bien que PG16 semble être prometteur en raison d'un caractère amphipatique plus important et d'une capacité d'insertion membranaire plus prononcée que CADY, il ne montre cependant pas de différence significative en terme d'activité biologique *in cellulo*. Son caractère hydrophile plus prononcé et sa forte affinité aux lipides semblent le rendre un peu moins efficace que CADY comme outil de transfection pour les siRNA.

De son côté, PG9 montre plus de différence dans sa séquence primaire comparé à CADY, néanmoins ce vecteur est toujours capable de former des nanoparticules avec un siRNA. Le peptide ne montre ni d'amphipaticité, ni d'insertion prononcée dans des monocouches lipidiques. Néanmoins, il est capable de délivrer un siRNA *in cellulo* avec une efficacité un peu inférieure à celle de CADY/siRNA.

En résumé, les effets de PG16/siRNA et PG9/siRNA sont moins importants que ceux observés avec les nanoparticules CADY/siRNA. Le vecteur CADY reste donc le meilleur candidat pour le développement d'un outil thérapeutique de transfection en vue d'une application *in vivo*.

Pour cela, le chapitre suivant du manuscrit se focalisera sur l'optimisation de la formulation des nanoparticules CADY/siRNA afin de les rendre plus stables tout en maintenant leur activité biologique, ainsi que sur l'ajout d'entités permettant d'améliorer la biodisponibilité et le ciblage cellulaire.

CHAPITRE 4 – Optimisation de la formulation des nanoparticules CADY/siRNA

1. Introduction générale

Les expériences *in cellulo* et *in vivo* sont des aspects essentiels pour la validation de futurs « médicaments » qui nécessitent des protocoles exigeants et standardisés. L'un des atouts les plus importants dans la recherche biomédicale est de pouvoir adapter l'agent thérapeutique à différentes conditions. *In cellulo*, l'agent thérapeutique doit garder son intégrité dans les différents milieux rencontrés avant son internalisation cellulaire. *In vivo*, il doit être compatible avec la voie d'administration choisie (orale, intraveineuse, sous-cutanée, etc.) et être capable de traverser les différentes barrières de l'organisme qui en découlent (épithélium, endothélium, membrane cellulaire, etc.), avant d'atteindre sa cible. Ainsi, la vectorisation des médicaments est aujourd'hui un axe important de recherche dans le domaine pharmaceutique puisqu'elle consiste à protéger et préserver au mieux l'agent thérapeutique de ces différents obstacles naturels.

Comme nous avons pu le constater dans le chapitre précédent en tentant d'optimiser la séquence primaire de CADY, les capacités d'internalisation d'un peptide vecteur sont fortement corrélées à sa séquence primaire et à la nature même des acides aminés qui la composent. Cependant, le développement de la stratégie non covalente et l'optimisation des autoassemblages CPPs/cargaison nécessitent également la prise en compte de la stabilité des nanoparticules, élément jouant grandement sur leur devenir *in cellulo* et *in vivo*.

En effet, nous avons pu mettre en évidence que le ratio molaire des nanoparticules CPP/siRNA pouvait fortement influencer leur efficacité d'internalisation. Nous observons une efficacité optimale du siRNA *in cellulo*, lorsque celui-ci est vectorisé à des ratios molaires entre 20/1 et 40/1 (CADY/siRNA). Etant donné que la formation de ces particules est principalement basée sur des interactions électrostatiques, il est par ailleurs primordial de pouvoir standardiser et maitriser leur formulation afin d'obtenir des nanoparticules stables dans les différents milieux extracellulaires en vue d'une application *in vivo*.

Dans le cas d'une administration par voie systémique, la prise en charge par les protéines sériques, l'opsonisation et le tropisme pour le système phagocytaire mononuclée constituent des inconvénients majeurs pour que les nanoparticules atteignent leur cible *in vivo*. Dans la littérature de nombreuses solutions sont proposées autour de principes comme la stabilité de la formulation, l'amélioration de la biodisponibilité et le ciblage de tissus spécifiques (242–247). Pour cela les vecteurs peuvent être conjugués à des motifs comme des polyéthylènes glycols (PEG) et/ou à des ligands spécifiques de récepteurs exprimés par les cellules ciblées. De telles constructions dites « furtives » et « ciblées » sont des nanoparticules de 2ème et 3ème génération respectivement représentatives des optimisations apportées aux nanoparticules nues de 1ère génération (Figure 4.1).

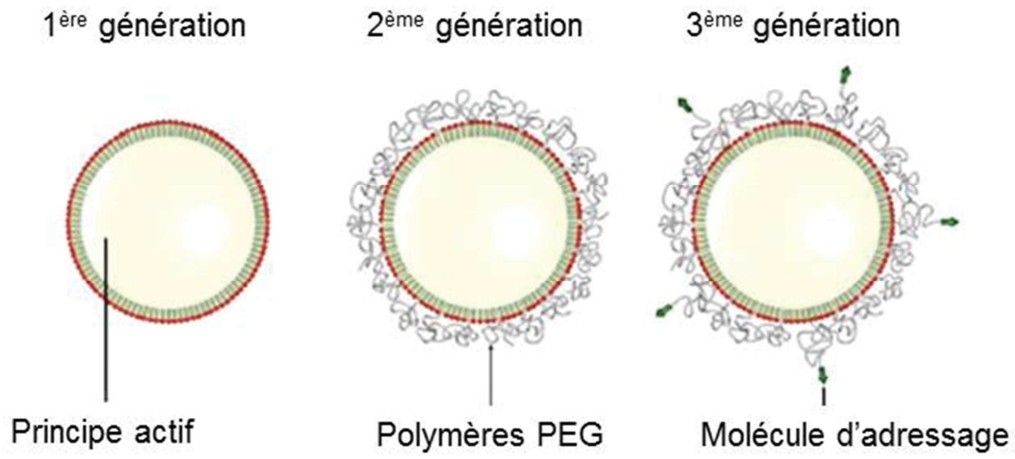


Figure 4.1 : Schéma représentatif des nanoparticules de 1ère, 2ème et 3ème génération. Les nanoparticules de 1ère génération contiennent un principe actif associé à un vecteur leur permettant d'être administrées *in vivo*. Les nanoparticules de 2ème génération ont des polymères PEG greffés en surface pour empêcher leur opsonisation et augmenter ainsi leur biodisponibilité. Les nanoparticules de 3ème génération sont des particules de 2ème génération décorées de molécules d'adressage moléculaire dans le but de cibler uniquement le tissu ou la cellule pathogène.

Dans une première partie de ce chapitre, nous étudierons les paramètres de formulation pouvant influencer la stabilité des nanoparticules CADY/siRNA ainsi que les techniques permettant de contrôler leur homogénéité. Dans un second temps, un motif PEG ainsi qu'une séquence peptidique conçue pour le ciblage spécifique du

cerveau seront couplés à la séquence de CADY dans le but de conférer aux nanoparticules CADY/siRNA des propriétés supplémentaires de stabilité et de ciblage, favorisant leur potentialisation dans le cadre d'applications *in vivo*. Nous déterminerons les caractéristiques physico-chimiques que ces modifications peuvent apporter au peptide où aux nanoparticules formées avec un siRNA ainsi que les effets sur la réponse biologique lors d'expérimentations *in cellulo*.

2. Formulation des nanoparticules CADY/siRNA en solution

2.1. Formulation en condition physiologique

Pouvoir manipuler un système de nanoparticules dans des conditions biologiques proches de celles rencontrées dans un organisme vivant est un atout majeur quant à son développement thérapeutique futur. Pour tester cela, nous avons placé dans un premier temps les nanoparticules CADY/siRNA dans des conditions de forces ioniques différentes, représentatives des milieux rencontrés lors des expériences *in cellulo,* puis évalué la taille moyenne et l'indice de polydispersité des particules en solutions (Figure 4.2).

La taille moyenne des particules CADY/siRNA en solution est drastiquement modifiée lorsque les particules sont formulées en présence de chlorure de sodium à concentration physiologique (0,154 M de NaCl) ou de tampon phosphate salin (PBS à 0,5X) comparé à un environnement d'eau ultra pure (Figure 4.2 (A)). On passe d'une taille moyenne de 125 ± 42 nm lorsque les complexes sont formulés dans l'eau à des tailles moyennes de 1838 ± 156 nm pour une solution saline et 2427 ± 513 nm pour le PBS 0,5X. L'augmentation de la force ionique entraine l'agrégation des particules sous forme d'un précipité parfois visible à l'œil nu.

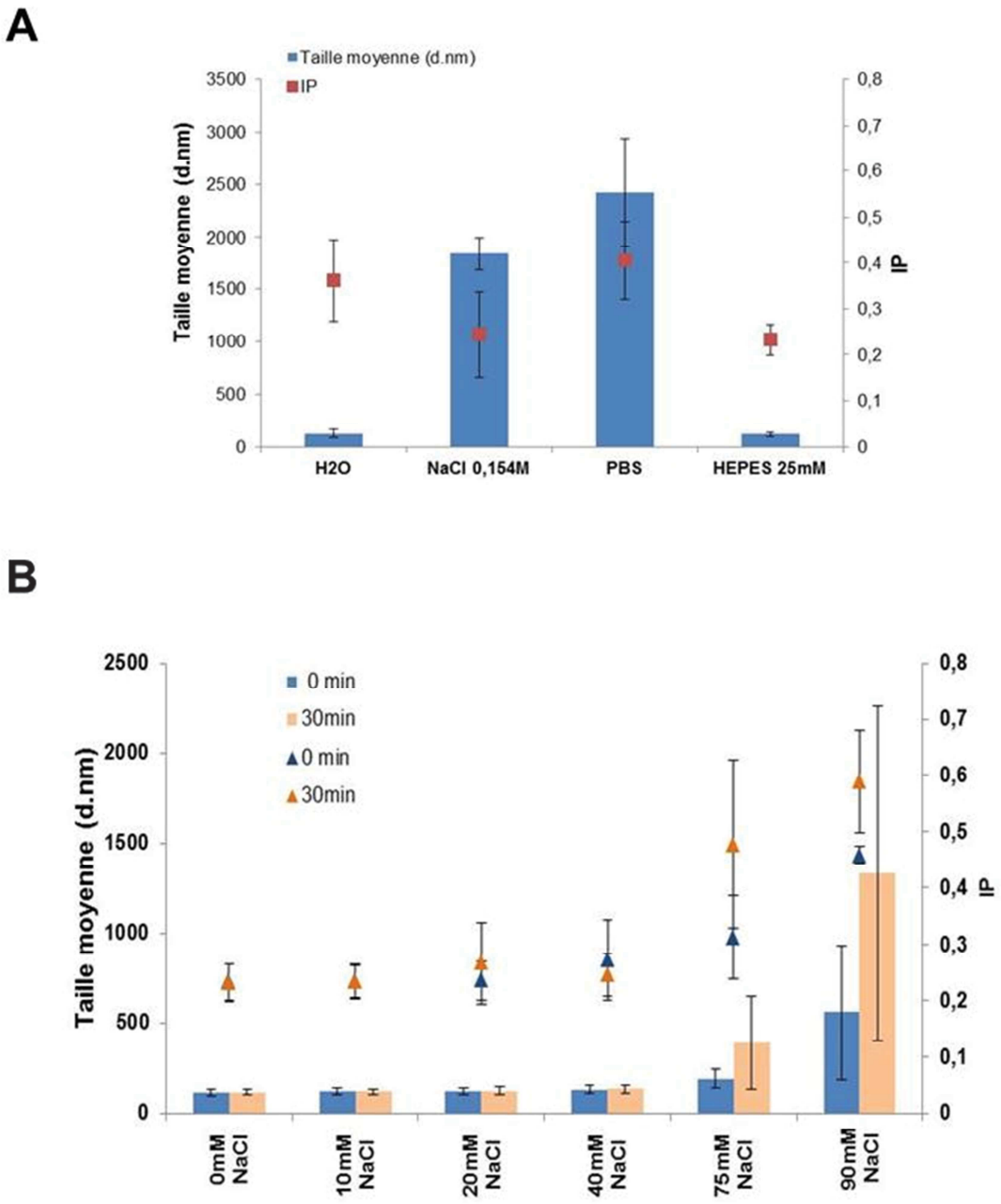


Figure 4.2 : Formulation des complexes CADY/siRNA dans différents milieux aqueux. (A) Les complexes (CADY/siRNA-CycB1) formulés dans l'eau ultra pure sont comparés à ceux formulés en présence de sel (0,154 M de NaCl) et de PBS (0,5X). **(B)** Les complexes (CADY/siRNA-GAPDH) sont formulés dans de l'HEPES pH 7.4 (25 mM) auxquels sont ajoutées des concentrations croissantes de sel (jusqu'à 90 mM de NaCl). Tous les complexes sont formulés à une concentration de CADY de 25 µM et un ratio R=40. Les mesures sont effectuées directement après formulation des complexes à t=0 min (tailles moyennes : barres en bleu clair ; IP : triangles en bleu foncé) puis 30 min après formulation (tailles moyennes: barres en orange clair ; IP : orange foncé).

Puisque l'intégrité et la stabilité des particules de CADY/siRNA sont compromises dans des conditions physiologiques classiques, les complexes ont été formulés dans un tampon HEPES (Figure 4.2 (B)). L'HEPES - un tampon couramment utilisé en culture cellulaire - est un composé zwitterionique avec un groupement sulfonique. Sa présence n'empêche pas la formation des particules, car on observe une taille moyenne de 117,0 ± 16,5 nm similaire à celle des particules CADY/siRNA formées dans l'eau ultra pure ainsi que des IP inférieurs à 0,3 montrant une bonne homogénéité des solutions colloïdales (Figure 4.2 (B)). Ensuite, lorsque l'on ajoute du NaCl à différentes concentrations les tailles moyennes et les indices de polydispersités restent constants jusqu'à un seuil situé autour de 40 mM (134,2 ± 24,7 nm). Pour des concentrations plus élevées en sel, la force ionique est suffisante pour induire à nouveau un processus d'écrantage des charges positives et conduire à la formation d'agrégats de taille supérieure à 1 µm comme montré pour la concentration de 90 mM de NaCl. Les tailles moyennes et l'IP ont été observés pendant 30 minutes après chaque ajout de sel et ces paramètres restent stables tant que le seuil de 40 mM en sel n'est pas atteint (Figure 4.2 (B)). A partir de cette concentration, les tailles et l'IP évoluent rapidement dans le temps de stabilisation de 30 min, par exemple à 75 mM de NaCl, ils passent respectivement de 191,9 ± 52,3 nm à 391,5 ± 256,9 nm et de 0,312 ± 0,073 à 0,478 ± 0,148. Cette augmentation de taille est d'autant plus grande que la concentration en sel augmente, ce qui révèle la force et la rapidité du phénomène d'agrégation.

Donc, comparée aux milieux tels que l'eau ultra pure ou l'HEPES, le PBS et NaCl induisent des phénomènes d'agrégation importants. Ces effets de sels ont déjà pu être observés pour d'autres peptides riches en R et W (248) ou pour des polymères cationiques (249).

Pour comprendre ces phénomènes d'agrégation, il faut savoir que la surface des nanoparticules CADY/siRNA porte une charge positive (potentiel zêta de 47,9 ± 3,0 mV (cf. CHAPITRE 2) pouvant normalement prévenir l'agrégation par répulsion électrostatique conformément à la théorie DLVO (250,251). Cette théorie décrit les variations du potentiel électrique aux abords de la surface d'une particule chargée en suspension : cette dernière est entourée de deux couches successives d'ions (double couche ionique) de charge opposée dont la première est très fortement liée et la deuxième plus diffuse. En présence d'une forte concentration en sel, un grand

nombre de contre-ions chlorures (Cl^-) va s'adsorber à la surface de la particule. L'accumulation des contre-ions va créer un écran d'ions autour de la particule et induire la contraction de sa double couche ionique. Il en résulte une diminution de la contribution électrostatique sur le potentiel de surface donc une diminution des répulsions électrostatiques entre particules qui seront ainsi sujettes à l'agrégation.

Le PBS est un soluté physiologique contenant essentiellement du NaCl et du phosphate di-sodique. Son pouvoir tampon repose sur le couple dihydrogéno-phosphate / hydrogénophosphate (pKa= 7,2), qui est par ailleurs un des trois grands mécanismes permettant le maintien du pH sanguin ($HPO_4^{2-} + H^+ = H_2PO_4^-$). Par son caractère physiologique, le PBS est un des tampons les plus utilisés en culture cellulaire.

Néanmoins, la formulation des nanoparticules en PBS 0.5X induit des précipités important qui ne sont probablement pas liés à la concentration de sel (68,5 mM) mais plutôt aux interactions entre les arginines de CADY et les phosphates. En effet, il est bien décrit dans la littérature que les groupements guanidinium des résidus arginines peuvent interagir avec des anions tels que le phosphate sous la forme de complexes bi-dentates (252,253) (Figure 4.3).

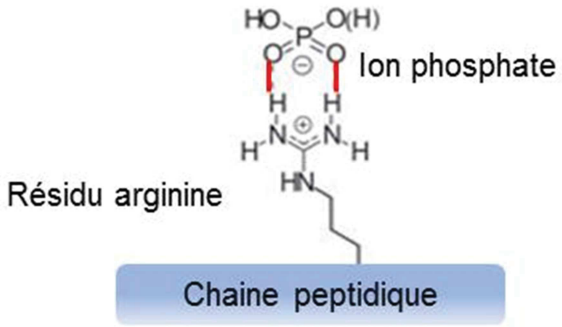


Figure 4.3 : Schéma du complexe formé entre un résidu arginine et un ion phosphate stabilisé par des liaisons hydrogènes (en rouge).

Pour conclure, nous recommandons de formuler les nanoparticules CADY/siRNA seulement dans de l'eau ultra pure ou de l'HEPES avec une concentration maximale de sel de 40 mM.

2.2. Formulation en présence d'excipients

Tout médicament est constitué d'une part d'un principe actif (la substance thérapeutique dont on suit les effets), et d'autre part d'excipients qui vont conférer à la substance active des qualités de stabilité, forme, dissolution, goût, couleur, esthétique, etc. Ces excipients sont extrêmement variés et ont pour rôles de faciliter la délivrance des principes actifs, d'en améliorer l'efficacité et d'en assurer la stabilité, la conservation et le stockage.

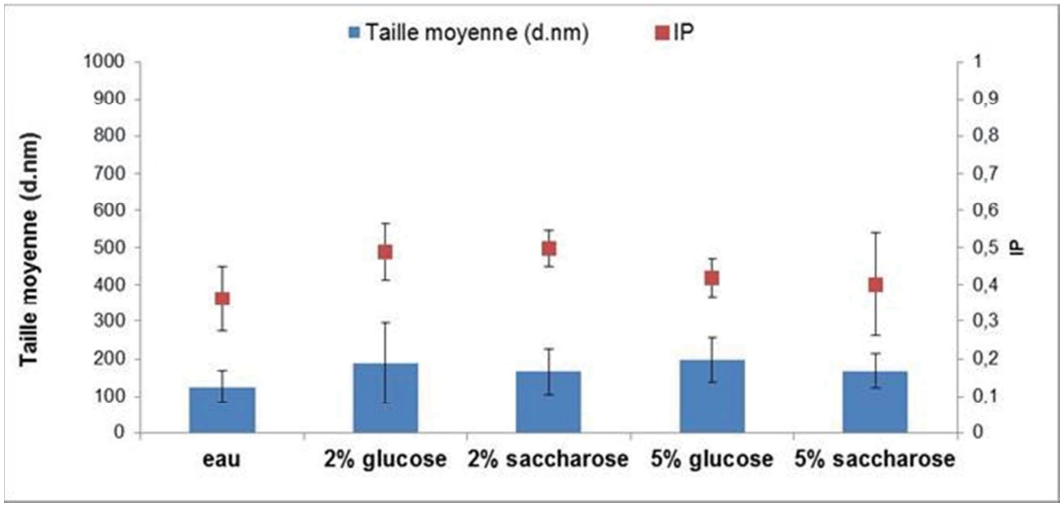


Figure 4.4 : Evaluation de l'influence d'excipients sur la formulation des nanoparticules CADY/siRNA. Les tailles moyennes et IPs de complexes CADY/siRNA-Cycline B1, formulés dans l'eau ultra pure, en présence de saccharose ou de glucose à différentes concentrations, ont été comparés par diffusion dynamique de la lumière. Tous les complexes sont formulés à une concentration de CADY de 25 µM et un ratio R=40.

En vue d'une étape de congélation/lyophilisation des complexes CADY/siRNA afin d'améliorer le stockage des nanoparticules (voir § 3.2.), nous avons choisi de tester le saccharose et le glucose pour leurs propriétés cryoprotectantes reconnues (254) mais aussi parce qu'ils sont facilement transférables à des applications en administration parentérale grâce à leur aptitude à maintenir l'isotonicité des cellules.

Quel que soit le pourcentage de l'excipient étudié, saccharose ou glucose, les tailles moyennes sont comprises entre 150 et 200 nm (Figure 4.4). Ces tailles sont proches de celles obtenues dans l'eau ultra pure, indiquant que le saccharose et le glucose

n'empêchent pas la formation des nanoparticules. Cependant ces formulations présentent des indices de polydispersité légèrement supérieurs à ceux obtenus pour des formulations dans l'eau (entre 0,4 et 0,5). Ceci est surtout observé pour les nanoparticules formulées dans 2% de glucose ou de saccharose.

Suite à ces résultats et ceux décris dans le paragraphe 3.1., nous avons choisi 5% de glucose comme condition standard pour toutes les formulations suivantes de CADY/siRNA.

2.3. Formulation en présence de sérum

Lors d'une administration intraveineuse de l'agent thérapeutique, celui-ci circule dans le sang, où il peut interagir avec de nombreux composants notamment des protéines sériques souvent responsables de la prise en charge par le système immunitaire non spécifique. Afin de comprendre l'action potentielle du sérum riche en protéines sur les nanoparticules CADY/siRNA, nous avons évalué leur stabilité en présence de sérum de veau fœtal complémenté. De plus, comme le PBS et l'HEPES, le sérum est aussi largement utilisé en culture cellulaire car il a l'avantage de fournir une importante variété de protéines permettant aux cellules de survivre et proliférer.

Généralement le sérum, dont le principal composant est l'albumine, contient des protéines sériques de haut poids moléculaire avec une conformation globulaire aux conditions physiologiques. On peut donc les définir comme une phase dispersée dans un milieu aqueux. Dotées de ces caractéristiques colloïdales (255), elles sont capables de diffuser la lumière d'une manière fiable comme indiqué par le corrélogramme (voir insert de la Figure 4.5 (A)). La mesure du sérum seul en DLS révèle un spectre d'intensité caractérisé par 2 pics distincts à 9 ± 1 nm et à 63 ± 12 nm alors que le spectre du complexe CADY/siRNA présente un pic unique dont la taille est centrée autour de 121 ± 1 nm.

Lorsque les particules CADY/siRNA sont diluées dans du sérum et aussitôt mesurées (t=0min), on observe trois pics. Si deux d'entre eux peuvent être attribués au sérum, le 3ème pic pourrait représenter les nanoparticules. Cependant, la taille

moyenne enregistrée est deux fois supérieure à celle obtenue pour les particules seules, autour de 260 nm au lieu de 121 nm (Figure 4.5 (B)).

Cette différence de taille pourrait-elle résulter d'interactions entre les nanoparticules et les protéines sériques ? Depuis une dizaine d'année, le concept de « *proteic corona* » ou couronne protéique qui a émergé dans la littérature pourrait donner une piste d'interprétation. Il décrit la capacité des protéines sériques à s'adsorber à la surface des nanoparticules d'une manière dynamique (256,257). On peut donc penser que le 3ème pic correspond à des nanoparticules entourées de protéines sériques adsorbées qui induisent une augmentation du diamètre jusqu'à 260 nm.

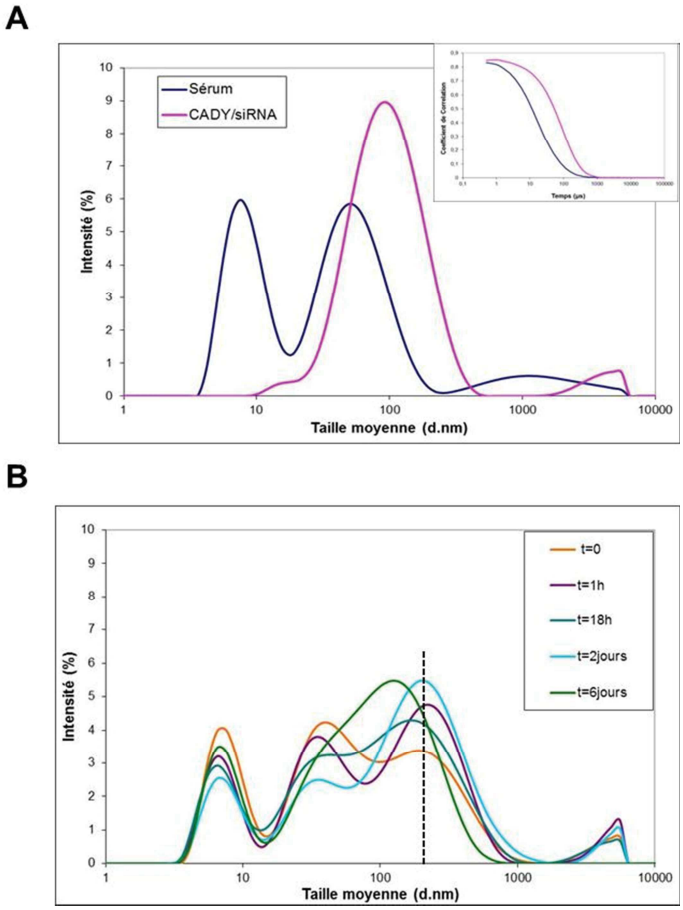


Figure 4.5 : Evaluation de la taille moyenne des complexes CADY/siRNA en présence de sérum. (A) Comparaison de la taille des particules du sérum de veau fœtal filtré (taille de pores : 0.22 µm) avec la taille des particules de CADY/siRNA-GAPDH dans 5% de glucose avec une concentration en peptide de 25 µM (R=40). Les corrélogrammes correspondants aux spectres en intensité sont présentés en insert. **(B)** Les solutions de particules de CADY/siRNA sont diluées dans du sérum et leur stabilité est observée sur 6 jours à température ambiante.

Au cours du temps et ce jusqu'à 6 jours, les pics correspondants aux protéines sériques (9 nm et 63 nm) sont toujours présents. Quant au 3ème pic, il évolue autour d'une valeur moyenne de 200 nm (représenté par le trait sur la Figure 4.5 (B)) entre 1 h, 18 h et 2 jours. Puis il laisse place à une population plus hétérogène comprise entre 60 et 150 nm, qui prend place entre 2 et 6 jours, ce qui suggère un changement ou même un désassemblage des complexes CADY/siRNA.

En résumé, les tailles moyennes des nanoparticules sont légèrement plus élevées (2x) en présence de sérum en raison d'une association probable avec des protéines sériques. Celles-ci restent stables au moins deux jours sans formation d'agrégats, contrairement à ce qui a pu être observé en présence de PBS ou de NaCl (Figure 4.2).

3. Standardisation du protocole de formulation des nanoparticules CADY/siRNA

Les essais de stabilité présentés dans le précédent paragraphe ont permis de constater que les particules de CADY/siRNA étaient sensibles à leur environnement et que la force ionique avait un rôle prépondérant dans l'instabilité des solutions colloïdales. Cependant, il est important de distinguer la stabilité des nanoparticules dans les différents milieux ou fluides biologiques rencontrés lors d'application *in cellulo* ou *in vivo* de la stabilité inhérente aux particules avant ces applications. En effet, la conservation des propriétés physico-chimiques des nanoparticules doit être garantie dans le temps. Pour cela, deux aspects vont être analysés dans la suite de ce travail afin de standardiser le protocole de formulation des nanoparticules de CADY/siRNA.

Dans un premier temps, nous allons vérifier si une étape de lyophilisation est applicable à notre système dans le but de préserver la stabilité des particules sous forme de poudre (§ 3.1.) puis, dans un second temps, nous allons appliquer des méthodes « physiques » (filtration ou extrusion) afin d'améliorer l'homogénéité des solutions colloïdales(§ 3.2.). Pour cloturer cette partie sur la formulation, nous allons évaluer l'influence de la concentration de CADY durant le processus de formulation

afin de déterminer si nous pouvons obtenir des nanoparticules à forte concentration (ou dose) en vue d'une administration *in vivo* (§ 3.3.).

3.1. Amélioration des conditions de stockage des nanoparticules CADY/siRNA

Comme démontré dans le CHAPITRE 2, les tailles moyennes et l'homogénéité des nanoparticules de CADY/siRNA ne varient pas pendant environ 3 semaines de stockage à température ambiante. Néanmoins, sur le moyen ou le long terme, la stabilité de nanoparticules dispersé dans une solution aqueuse peut être remise en cause par des phénomènes d'instabilité physique (agrégation, fusion) ou d'instabilité chimique (réactivité chimique des produits en solution, relargage des drogues) (258).

Afin d'obtenir des nanoparticules prêtes à l'emploi et durablement stockables, nous avons analysé la possibilité d'une conservation sous forme de poudre. Dans ce contexte, nous avons lyophilisé les particules de CADY/siRNA après formulation dans une solution aqueuse. La lyophilisation est un processus constitué d'une étape de congélation suivie d'une étape de sublimation du milieu aqueux de l'échantillon sous pression. La lyophilisation peut alors générer un « stress » déstabilisant les solutions colloïdales, ce qui explique l'utilisation généralisée d'excipients pour formuler les agents thérapeutiques (254,258). Nous avons précédemment vérifié que les complexes CADY/siRNA pouvaient être formés en présence d'excipients tels que le glucose et le saccharose avec une homogénéité sensiblement meilleure à 5% de glucose (CHAPITRE 4, § 2.2). Afin de valider cela, ces mêmes formulations ont ensuite été lyophilisées puis, après resuspension des lyophilisats, les paramètres colloïdaux ont été mesurés par DLS (Figure 4.6).

Au préalable, nous avons pu montrer que l'utilisation d'excipient était indispensable. En effet, les nanoparticules CADY/siRNA formulées dans une solution aqueuse sans excipient ne sont plus solubles après la lyophilisation. Pour cette raison, nous n'avons pas pu comparer les caractéristiques colloïdales des complexes formulés dans de l'eau ultra pure avec celles des complexes formulés en présence d'excipients (Figure 4.4).

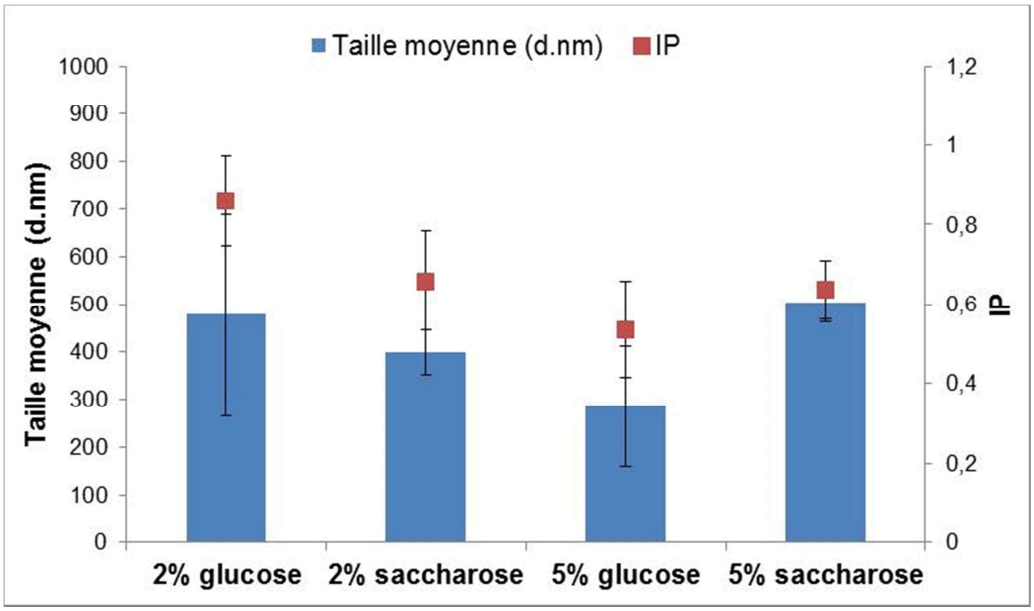


Figure 4.6 : Influence d'excipients sur la formulation des nanoparticules CADY/siRNA après lyophilisation. La taille moyenne et l'indice de polydispersité des complexes CADY/siRNA-CycB1 ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière après lyophilisation puis resuspension des lyophilisats dans un volume d'eau ultra pure équivalent à celui de départ. Tous les complexes sont formulés à une concentration de CADY de 25 µM et un ratio R=40.

Après lyophilisation et resuspension de la plupart des complexes, la taille moyenne des nanoparticules est significativement plus importante, avec des valeurs situées entre 400 nm et 500 nm. Il en est de même pour les indices de polydispersité dont les valeurs sont supérieures à 0,6. La seule condition de lyophilisation conduisant à des tailles moyennes (286 ± 126 nm) et des IPs (0,536 ± 0,122) proches de celles des nanoparticules formulées en solution aqueuse consiste en l'utilisation de glucose 5%. Au vu de ces résultats, la lyophilisation semble donc avoir un impact déstabilisant pour le stockage des nanoparticules CADY/siRNA.

Toutefois, des résultats préliminaires sur des nanoparticules formulées en 5% glucose ont montré que lorsque l'on obtenait des IP<0,3, les tailles moyennes étaient équivalentes avant et après lyophilisation (résultats non-montrés). Par conséquence, Nous nous sommes demandés si une amélioration de l'homogénéité initiale serait plus favorable à la conservation des paramètres après resuspension des lyophilisats. L'homogénéisation de la taille moyenne de nanoparticules CADY/siRNA peut être effectuée par filtration ou extrusion comme décrit dans le paragraphe suivant.

3.2. Amélioration de l'homogénéisation des solutions de nanoparticules CADY/siRNA

L'indice de polydispersité correspond à la variance de la distribution en taille des particules : plus il est faible et plus la solution contient des particules de tailles équivalentes. Mais, par déduction, il renseigne aussi sur l'autoassemblage entre le peptide CADY et le siRNA. La formation des complexes CADY/siRNA est un phénomène spontané, aucun traitement qu'il soit chimique ou physique n'est mis en œuvre pour le contrôler. On observe par conséquent des écarts sur les tailles moyennes de complexes (taille moyenne entre 80 nm et 200 nm) et sur leur homogénéité (IP entre 0,25 et 0,42) lors des mesures de diffusion dynamique de la lumière. Il devient alors intéressant de savoir si la non-calibration de ces paramètres peut influencer les différentes étapes telles que la lyophilisation ou l'efficacité de transfection. S'il est encore difficile d'appréhender l'origine de ces divergences et/ou de contrôler l'autoassemblage qui permettrait de s'en affranchir, il parait essentiel de trouver un moyen d'obtenir avant usage des formulations homogènes.

Pour améliorer l'homogénéité des solutions colloïdaless nous avons introduit une étape de filtration en utilisant une membrane de polycarbonate avec des pores de 0,22 µm. Cette étape entraine une diminution significative de la taille moyenne des particules (~122 nm) mais aussi de l'indice de polydispersité (<0,4). Afin de vérifier que la filtration ne détruit pas les particules et que le peptide ne se trouve pas seul en solution, un spectre de dichroïsme circulaire de la solution filtrée est réalisé. Il confirme par la présence d'une structure en hélice α que le peptide présent après filtration est complexé au siRNA. Même si ces premiers résultats semblent être encourageants, cette stratégie a dû être abandonnée suite à une perte importante en peptide, de l'ordre de 45% (Tableau 4.1):

Tableau 4.1 : Application d'une étape d'homogénéisation des particules en solution

	Taille moyenne (d.nm) avant	IP	Taille moyenne (d.nm) après	IP	% perte	Hélice en CD
1 passage	121,7 ± 0,1	0,397 ± 0,011	66,4 ± 4,2	0,286 ± 0,004	45	oui
9 passages	78,7 ± 0,2	0,335 ± 0,039	79,0 ± 0,3	0,252 ± 0,001	75	oui
18 passages	70,4 ± 0,4	0,358 ± 0,014	76,8 ± 0,4	0,267 ± 0,007	17	oui
25 passages	104,3 ± 11,5	0,330 ± 0,049	82,8 ± 2,6	0,193 ± 0,013	7,5	oui

Notes : Solution de CADY/siRNA-GAPDH à 25 µM en peptide, formulé dans 5% de glucose (R=40). La filtration est effectuée sur une membrane de polycarbonate à 0,22 µm (millex G20). L'extrusion est effectuée sur une membrane de polycarbonate à 0,1 µm. Mesure de la taille moyenne et de l'IP des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. Le % de perte correspond à la différence de concentration molaire de peptide avant et après filtration/extrusion en mesurant l'absorbance des solutions. Par dichroïsme circulaire, on vérifie la présence d'une hélice comme structure secondaire du peptide complexé après filtration/extrusion.

Si l'étape de filtration s'effectue en un seul passage, l'extrusion peut s'effectuer sur plusieurs passages sur la même membrane (100 nm) afin d'homogénéiser au maximum la taille des nanoparticules. Les solutions colloïdales de CADY/siRNA ont donc été extrudées sur 9, 18 ou 25 passages à travers la membrane (Tableau 4.1). Les tailles moyennes des particules sont semblables avant et après l'extrusion. En effet, pour les expériences à 9 et 18 passages, les tailles moyennes enregistrées avant traitement étaient déjà inférieures à la taille des pores de la membrane (0,1 µm). Cependant, l'indice de polydispersité est nettement amélioré indiquant que l'étape d'extrusion permet d'homogénéiser les tailles des nanoparticules. De même que pour la filtration, les complexes sont toujours présents après l'étape d'extrusion puisque le spectre de dichroïsme circulaire correspond à une structure hélicoïdale. Cependant, la perte de peptide est importante suite à l'extrusion avec 9 passages (75%), mais il semble qu'augmenter le nombre de passages durant l'extrusion

permet de limiter cette perte. En effet, 17% et 7,5% de pertes sont observés respectivement pour 18 passages et 25 passages.
Comparé à la filtration, l'extrusion avec 25 passages donne la possibilité d'obtenir des solutions colloïdales avec une meilleure homogénéité tout en conservant un maximum de matériel en suspension.

3.3. Influence de la concentration de CADY sur la formation des nanoparticules

A ce stade, nous sommes capables d'obtenir des nanoparticules CADY/siRNA homogènes et stables en présence de 5% de glucose, et en incluant dans le protocole une étape supplémentaire d'extrusion suivie d'une étape de lyophilisation.

L'objectif suivant consiste à évaluer l'influence de la concentration de CADY sur la formation des nanoparticules. Pour les expériences *in vivo* sur différentes espèces et même pour les premiers essais de toxicologie, il est important de pouvoir administrer des doses plus élevées allant jusqu'à plusieurs micromoles.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'influence de trois concentrations de CADY (10 µM, 25 µM et 80 µM) sur l'autoassemblage avec un siRNA (à un ratio constant de R=40) en contrôlant les différentes étapes (extrusion, lyophilisation) (Figure 4.7).

Avant extrusion, le profil des distributions en taille est relativement différent pour chaque concentration. Pour les nanoparticules générées à partir de 10 µM de CADY, on observe deux populations distinctes avec des pics centrés autour de 80 nm et 230 nm (Figure 4.7 (A)). Avec une concentration de CADY à 25 µM, on retrouve une population autour de 100 nm plus ou moins homogène (Figure 4.7 (B)), comme décrit dans les chapitres précédents. Finalement, pour les nanoparticules générées à partir de CADY à 80 µM, une population similaire à celle formée à partir de CADY à 10 µM est identifiée, mais avec des pics plus importants autour de 141 nm et 825 nm (Figure 4.7 (C)).

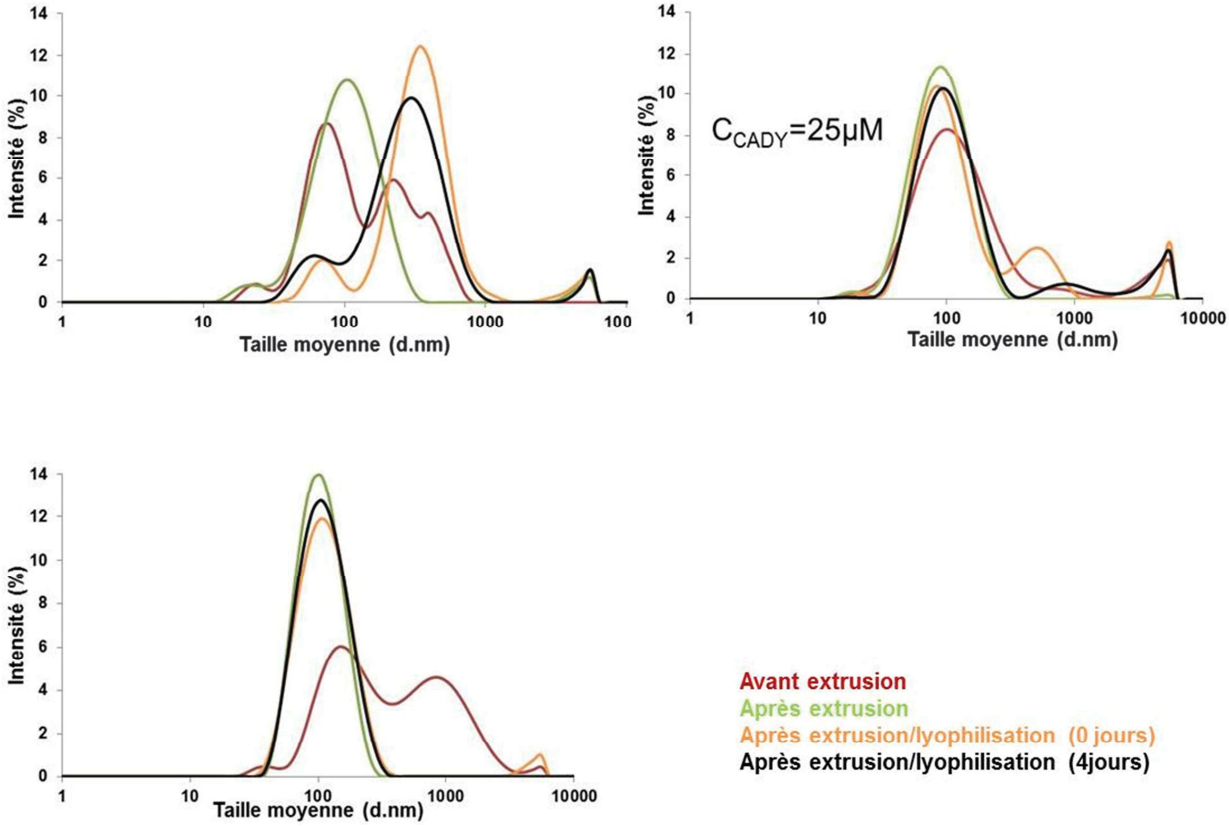


Figure 4.7 : Evaluation de la stabilité des complexes de CADY/siRNA formulés avec différentes concentrations de CADY. Le spectre des tailles moyennes a été déterminé pour toutes les particules formulées dans 5% de glucose, à un ratio molaire R=40, et à une concentration de CADY de 10 µM **(A**), 25 µM **(B)** ou 80 µM **(C)**. Ces solutions sont ensuite extrudées (25 passages), lyophilisées, resuspendues puis conservées jusqu'à 4 jours à température ambiante.

Après extrusion, les distributions en taille affichent une seule population centrée respectivement autour de 88 nm (IP=0,343), 68 nm (IP=0,228) et 95 nm (IP=0,127) pour 10 µM, 25 µM et 80 µM (Figure 4.5 (A, B, C)).

Après lyophilisation, nous obtenons des distributions en taille presque identiques à celles obtenues après extrusion, en particulier à 25 µM et 80 µM de CADY. Curieusement, pour les nanoparticules obtenues avec CADY à 10 µM, on observe un décalage de la taille moyenne, plutôt centrée à 308 nm au lieu de 88 nm. La lyophilisation semble donc avoir un effet déstabilisant sur les nanoparticules de faible concentration en CADY.

Afin d'évaluer l'influence de la concentration des formulations sur le vieillissement des solutions, nous les avons analysées 4 jours post-formulation (Figure 4.7,

spectres noirs). Pour chaque condition, les distributions en taille restent stables et ne différent pas de celles mesurées directement après la lyophilisation/resuspension des complexes (Figure 4.7, spectres jaunes).

Il semblerait donc qu'une augmentation de la concentration (80 µM) permette d'obtenir des nanoparticules avec une meilleure stabilisation des paramètres colloïdaux après extrusion et lyophilisation, gardant le maximum de matériel en suspension.

Pour clore ce chapitre, nous avons évalué les effets potentiels des protéines sériques sur nos nanoparticules formulées dans les nouvelles conditions optimisées (CADY 80 µM en 5% de glucose, R=40, extrusion, lyophilisation, resuspension) (Figure 4.8). En présence de sérum, le profil des distributions en taille fait apparaître les pics caractéristiques du sérum autour de 7-8 nm et 45-50 nm et le pic correspondant aux nanoparticules est centré à une taille trois fois supérieure (~310 nm) à celle obtenue en absence de sérum (~100 nm) (Figure 4.6). Comme montré précédemment (CHAPITRE 4, § 2.3.), les protéines sériques pourraient être impliquées dans cette augmentation de la taille des particules. Toutefois, on peut une nouvelle fois souligner la stabilité des formulations dans le sérum et ce jusqu'à 2 jours.

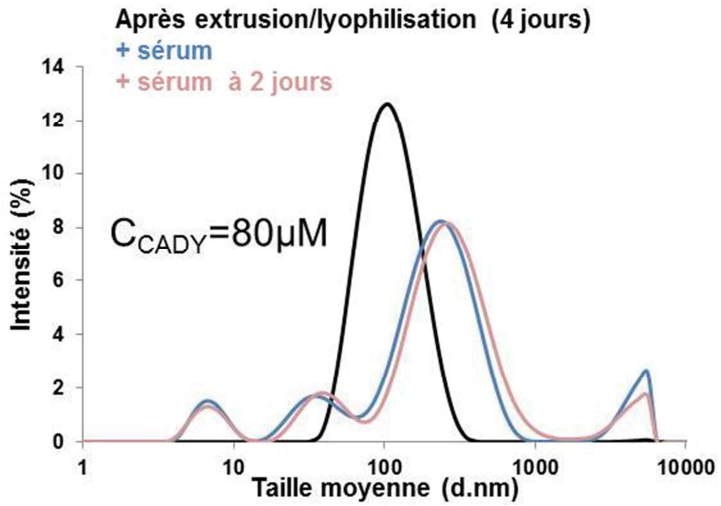


Figure 4.8 : Evaluation de la stabilité des complexes de CADY/siRNA en présence de sérum. Les spectres des tailles moyennes ont été déterminés par DLS pour des nanoparticules CADY/siRNA-Cycline B1 formulées dans 5% de glucose à un ratio molaire R=40 (80 µM de CADY), extrudées, lyophilisées, resuspendues puis conservées jusqu'à 4 jours à température ambiante. Cette solution a été ensuite placée dans du sérum pour une mesure immédiate puis après 2 jours.

Pour conclure, l'ajout des étapes d'extrusion et de lyophilisation permet non seulement d'homogénéiser les tailles des nanoparticules mais aussi de les stocker sous forme de poudre. Cette poudre peut être finement dispersée dans une solution aqueuse, tout en gardant les propriétés physico-chimiques des nanoparticules CADY/siRNA initiales.

3.4. Etablissement et validation d'un protocole standard de formulation

Suite aux résultats obtenus dans les paragraphes et chapitres précédents, nous proposons un protocole standard pour formuler des nanoparticules CADY/siRNA incluant les 5 étapes suivantes :

1. Solubilisation de CADY qui comprend une étape de sonication, centrifugation, filtration et dosage du surnageant afin de travailler avec des solutions mères de qualité identique.
2. Utilisation de CADY à 80 µM pour initier l'autoassemblage avec un siRNA (ne pas utiliser des concentrations inférieures à 25 µM de CADY).
3. Formulation des nanoparticules CADY/siRNA dans une solution aqueuse avec 5% de glucose.
4. Homogénéisation de la taille des nanoparticules par extrusion (25 passages sur membrane de 100 nm).
5. Lyophilisation pour conservation des nanoparticules sous forme de poudre.

Finalement, pour valider ce protocole standard pour la formulation des nanoparticules CADY/siRNA, leur activité biologique a été évaluée *in cellulo* en comparaison avec des nanoparticules CADY/siRNA fraichement formulées (Figure 4.9).

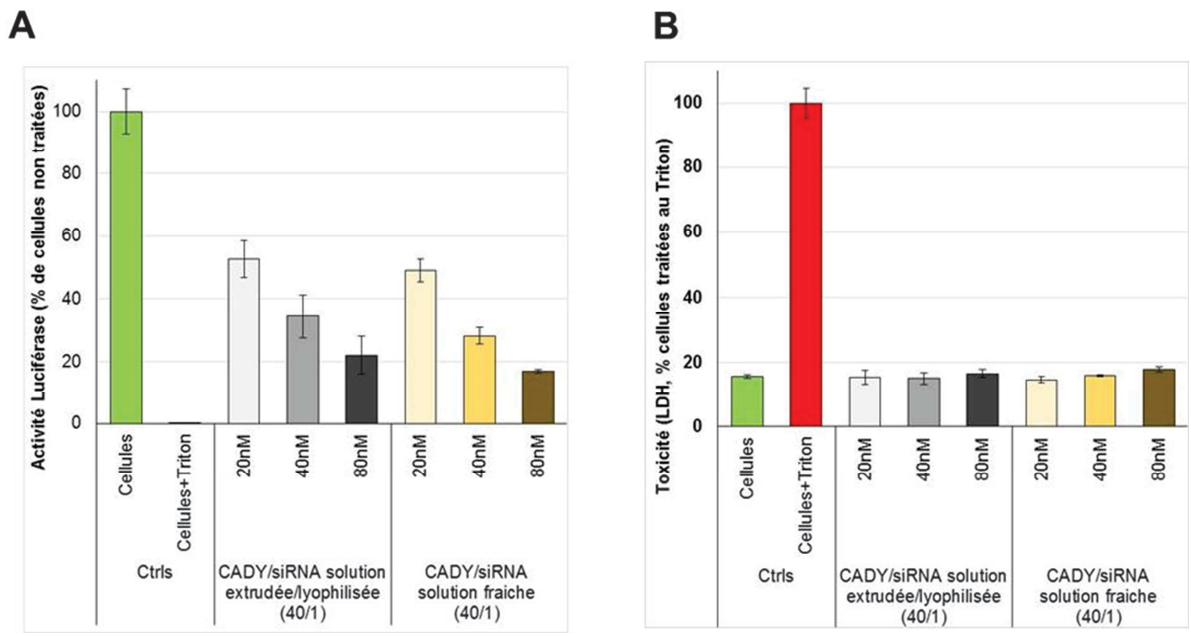


Figure 4.9 : Activité biologique *in cellulo* et toxicité des complexes CADY/siRNA. Les complexes formulés à une concentration de 80 µM CADY (R=40/1, eau ultra pure avec 5% de glucose) sont dilués et testés à différentes concentrations de siRNA-Luc (20, 40 et 80 nM) sur des cellules de mélanome murin B16-Luc+. En parallèle, une solution de complexes 80 µM CADY/siRNA sans d'étape d'extrusion/lyophilisation est fraichement préparée puis testée dans les mêmes conditions. Pour chaque concentration de siRNA, l'activité de la luciférase est déterminée par luminométrie **(A)** et la toxicité est mesurée à l'aide d'un kit LDH **(B)**. Les cellules traitées avec du triton représentent le contrôle positif du kit LDH (toxicité maximale). Le graphique représente la moyenne et les écart-types de trois mesures indépendantes (n=3).

Nous pouvons observer que CADY/siRNA-Luc montre une efficacité dose dépendante sur la répression de l'activité de la luciférase des cellules B16-Luc+ lorsque les complexes ont été formulés selon le protocole standard (solution mère de 80 µM CADY/siRNA, R=40). Plus la concentration en siRNA déposée sur les cellules est élevée et plus le « *knock-down* » est important, allant jusqu'à une réduction du signal de luciférase de près de 80% pour une concentration finale de 80 nM de siRNA. On obtient une dose-réponse équivalente pour le contrôle interne (solutions « fraiches ») montrant que les étapes d'extrusion et de lyophilisation n'ont pas d'effet néfaste sur la formulation et sur l'intégrité du siRNA.

En termes de toxicité, les concentrations croissantes de CADY/siRNA ne sont pas corrélées avec une augmentation de la mort cellulaire. Quel que soit le traitement

subi par les complexes CADY/siRNA-Luc, les valeurs de toxicité sont équivalentes à celles des cellules non traitées (< 20%).

En résumé, l'extrusion et la lyophilisation sont des étapes non-destructrices pour les complexes CADY/siRNA. Elles permettent une amélioration de l'homogénéité des particules ainsi qu'une stabilisation sous la forme de lyophilisat conservant les propriétés de transfection du CPP sans toxicité supplémentaire.

En définitif, CADY est un outil de délivrance performant pour le siRNA de par sa capacité à transfecter un nombre important de lignées cellulaires (152) et ses propriétés colloïdales intéressantes en termes de taille et de charge. Sa formulation très sensible à la force ionique du solvant peut cependant être standardisée à l'aide d'étapes d'homogénéisation et de lyophilisation à forte concentration et en présence d'excipient tel que le glucose.

Afin d'utiliser la technologie CADY/siRNA dans des applications thérapeutiques, notre prochain objectif est d'améliorer les propriétés du peptide en incluant des motifs de biodisponibilité et de ciblage pour former des nanoparticules de 2ème génération.

4. Ajout d'une séquence de ciblage pour une délivrance spécifique de CADY/siRNA

Parallèlement à l'étude du vecteur CADY, nous avons également évalué la possibilité de greffer des motifs de ciblage spécifique sur la séquence du peptide. En effet, si les premiers résultats obtenus *in vitro* (152,259) avec la séquence originale de CADY sont relativement prometteurs, la notion de ciblage de tissus spécifiques est primordiale si l'on souhaite accroître la sélectivité et la biodisponibilité des nanoparticules CADY/siRNA.

Dans ce contexte, nous avons développé une séquence peptidique nommée PCY4 pour délivrer des siRNA dans les cellules de l'encéphale. PCY4 est constitué de la séquence primaire de CADY (sans alanine et cystéamide en position C-terminale), sur laquelle a été ajouté en position N-terminale le peptide YIGSR-S (5 résidus + sérine en tant qu'espaceur). Le peptide YIGSR est une séquence active dérivée de

la chaîne β1 de la laminine, une protéine qui est fortement exprimée sur la lame basale des cellules endothéliales notamment celles de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (260,261). YIGSR interagit avec la "*Laminin binding protein*" (67LR) - une protéine membranaire de 67 kDa hautement exprimée sur les cellules endothéliales (262). De plus, plusieurs groupes ont montré une diminution de la croissance des cellules cancéreuses traitées avec la séquence YIGSR (263–265).

Dans ce paragraphe, nous avons donc caractérisé *in vitro*, *in cellulo* puis *in vivo* la capacité de PCY4 à former des nanoparticules PCY4/siRNA capables de traverser la BHE et cibler plus spécifiquement des cellules neuronales (ou le cerveau en général).

4.1. Caractéristiques biophysiques de PCY4 comparé à CADY

Le potentiel de CADY en tant que vecteur d'oligonucléotide repose sur ses caractéristiques biophysiques, et plus précisément sur sa versatilité structurale ainsi que sur sa forte propension à interagir avec les lipides (153). Le fragment YIGSR-S amène une charge positive supplémentaire (arginine) et deux résidus polaires (sérine) par rapport à CADY. Le coefficient GRAVY recalculé passe de 0,175 (CADY) à -0,064 (PCY4) lorsqu'on ajoute la séquence de ciblage. Cette dernière apporte donc un caractère plus hydrophile au peptide PCY4. L'ajout de la séquence de ciblage ne doit pas interférer sur les propriétés du peptide. Nous allons donc vérifier dans quelle mesure PCY4 conserve les propriétés de CADY.

Dans un premier temps, la capacité de PCY4 à se structurer en hélice alpha sera étudiée par modélisation moléculaire puis par dichroïsme circulaire (Figure 4.10). Le modèle le plus stable énergétiquement selon le logiciel « *I-Tasser* » présente une hélice alpha comme conformation dominante sur le fragment de séquence correspondant à CADY, et une partie non structurée en position N-terminale correspondant au fragment YIGSR-S. L'hélice est stabilisée par deux interactions de type π-*cation* ($Y^{1}\rightarrow R^{10}$; $W^{13}\rightarrow R^{17}$) et une interaction de type π-*stacking* ($W^{20}\leftrightarrow W^{24}$). Ainsi stabilisée, l'hélice présente un caractère amphipathique avec une ségrégation de trois zones distinctes : celle des résidus W, très proche dans l'espace de celle des

résidus R, ainsi que la zone des résidus L. Ce modèle est très semblable à celui de CADY, puisque seule l'interaction π-*cation* qui maintenait les premiers résidus W^3 et R^4 de la séquence de CADY (cf. CHAPITRE 3, § 1) a disparu pour PCY4. Cette même R (R^4 de CADY = R^{10} de PCY4) contribue à l'interaction $Y^1 \rightarrow R^{10}$ qui semble fixer le fragment YIGSR-S alors même qu'elle ne participe pas à la structure en hélice (Figure 4.8 (A)).

Par la suite, la structure secondaire de PCY4 a été déterminée par dichroïsme circulaire dans différents environnements. Lorsque le peptide est seul en solution, son spectre CD est proche de celui d'une structure désordonnée (Figure 4.10 (B)). On observe un minimum à 205 nm au lieu de 198 nm et une ellipticité molaire légèrement supérieure à 0 $deg*cm^{-1}*dmol^{-1}$ à une longueur d'onde de 190 nm au lieu des valeurs négatives typiquement détectées sur une structure « *random-coil* ». Cette allure est similaire au spectre de CADY dans l'eau ultra pure. Tout comme ce dernier, ce faible décalage suggère une légère tendance à adopter une conformation particulière et/ou de faibles contributions hélicoïdales, laissant supposer que le peptide n'est pas entièrement désordonné (Figure 4.10 (B)). En effet, en présence de siRNA, PCY4 présente les 2 minima caractéristiques d'une structure hélicoïdale, à 207 nm et 222 nm. Aux ratios molaires peptide/siRNA R=20 et R=40, les spectres sont identiques avec une amplitude importante indiquant une consolidation de l'hélice alpha.

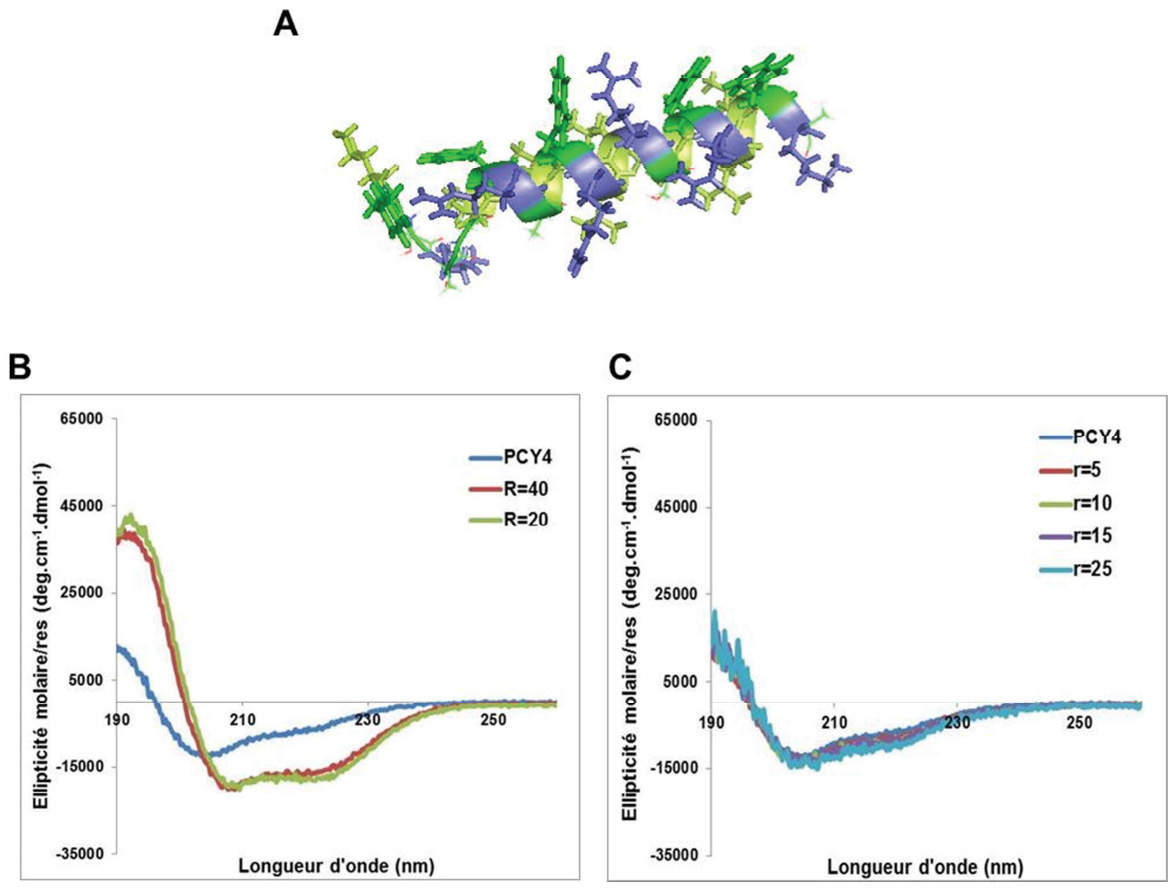


Figure 4.10 : Détermination de la structure secondaire de PCY4. (A) Modèle moléculaire déterminé par « *I-Tasser* ». Les spectres de dichroïsme circulaire sont mesurés dans l'UV-lointain dans de l'eau ultra pure pour le peptide (40 µM) seul puis en présence de siRNA-GAPDH à R=20, 40 **(B)** puis à différents ratios molaires de liposome du type DOPC/SM/Chol (lipides/peptides r=5, 10, 15, 25) **(C)**.

En revanche, en présence de lipides, le spectre de PCY4 n'évolue pas quel que soit le ratio lipides/peptides (r=5, 10, 15, 25) utilisé, restant identique à celui du peptide seul en solution (Figure 4.10 (C)). En comparaison, on observait un passage d'une structure désordonnée à une hélice alpha assez limité pour CADY en présence de lipides neutres (CHAPITRE 3, § 4.2.1). Néanmoins, il est possible que PCY4 par son fragment CADY puisse effectivement interagir avec les liposomes de DOPC/SM/Chol sans toutefois induire un changement conformationnel important.

Tableau 4.2 : Valeurs caractéristiques de l'amphipathicité de PCY4 et de son insertion dans des monocouches lipidiques.

CPP	CMC (nM)	Πsat (mN/m)	MIP DOPC/SM/Chol (mN/m)	MIP DOPG (mN/m)
PCY4	80	33	21	26
CADY	130	30	24	40

Notes : CMC, la concentration micellaire critique et Πsat, la pression de saturation : valeurs à partir desquelles PCY4 sature une interface eau/air. MIP, pression d'insertion maximum : valeur de la pression exercée par une monocouche lipidique sur une interface eau/air à partir de laquelle PCY4 ne peut plus s'insérer dans la dite monocouche.

Pour finaliser la comparaison entre PCY4 et CADY, le comportement de PCY4 aux interfaces eau/air a été évalué par des tests d'adsorption et d'insertion dans des cuves de Langmuir. L'adsorption de PCY4 sur une interface eau/air indique qu'il sature l'interface à une pression Πsat de 33 mN/m et une concentration CMC de 80nM (Tableau 4.3). Ces valeurs confirment son fort caractère amphipathique et sa capacité à se placer aux interfaces hydrophile/hydrophobe (eau/air). La saturation de l'interface en fonction de la concentration en peptide est un phénomène généralement proportionnel à la propriété amphipathique du peptide. Même si PCY4 révèle une Πsat similaire à CADY (33 mN/m et 30 mN/m), ce peptide est plus amphipathique que CADY car il possède une plus petite CMC (80 nM au lieu de 130 nM).

L'insertion de PCY4 dans des monocouches de DOPC/SM/Chol et de DOPG génère des pressions maximales d'insertion respectivement de 21 mN/m et 26 mN/m, qui sont inférieures à la pression latérale d'une membrane biologique (30-35 mN/m, (239)). On peut en déduire que l'insertion de PCY4 est plus difficile dans des monocouches neutres (DOPC/SM/Chol) que dans des monocouches chargées (DOPG), et que l'insertion dans une membrane biologique pourrait probablement être limitée.

En résumé, ces premiers résultats sur les spécificités biophysiques de PCY4 montrent que malgré un caractère hydrophile plus prononcé que CADY, c'est un peptide amphipathique capable d'adopter une structure hélicoïdale notamment

lorsqu'il est complexé au siRNA. Cependant, il ne se structure pas en présence de lipides neutres et son insertion dans des monocouches lipidiques semble facilitée lorsque ces dernières sont chargées.

4.2. Évaluation des nanoparticules PCY4/siRNA *versus* CADY/siRNA *in vitro*

Afin de contrôler la formation des nanoparticules PCY4/siRNA, leur taille ainsi que l'homogénéité des solutions colloïdales ont été contrôlées par diffusion dynamique de la lumière. Ainsi, pour les complexes CADY/siRNA et PCY4/siRNA, nous mesurons respectivement des tailles moyennes de 106 ± 31 nm et de 97 ± 30 nm, et des IP de 0,357 ± 0,053 et 0,318 ± 0,059 (Tableau 4.3). On peut considérer que les valeurs des tailles moyennes ne sont pas significativement différentes puisqu'elles sont comprises dans l'intervalle dans lequel sont généralement observées les tailles de nos nanoparticules (80 nm < tailles moyennes< 130 nm).

Tableau 4.3 : Taille moyenne et indice de polydispersité des complexes CADY/siRNA et PCY4/siRNA.

CPPs	Taille moyenne (d.nm)	IP
CADY	106 ± 31	0,357 ± 0,053
PCY4	97 ± 30	0,318 ± 0,059

Notes : les complexes sont formulés dans 5% de glucose avec du siRNA-GAPDH (CADY) et siRNA-Cycline B1 (PCY4) à un ratio molaire de 40 et une concentration de CPP de 25 µM. Les résultats présentés sont une moyenne de 5 et 3 mesures indépendantes respectivement pour CADY/siRNA et PCY4/siRNA.

Par la suite, la stabilité des nanoparticules PCY4/siRNA a été testée en présence d'héparane sulfate (HS). Comme décrit dans le CHAPITRE 3, § 4.1.2., l'HS est un constituant de la matrice extracellulaire chargé négativement capable d'entrer en compétition avec le siRNA pour l'interaction avec le CPP chargé positivement.

Pour cela, les complexes sont incubés en absence ou en présence d'HS puis le relargage du siRNA est observé par migration électrophorétique sur gel d'agarose (Figure 4.11). En absence d'HS, aucun siRNA n'est capable de migrer dans le gel d'agarose montrant que celui-ci est complètement complexé par le CPP, quel que soit le peptide (CADY ou PCY4) ou le ratio (R=20 ou R=40) utilisé.

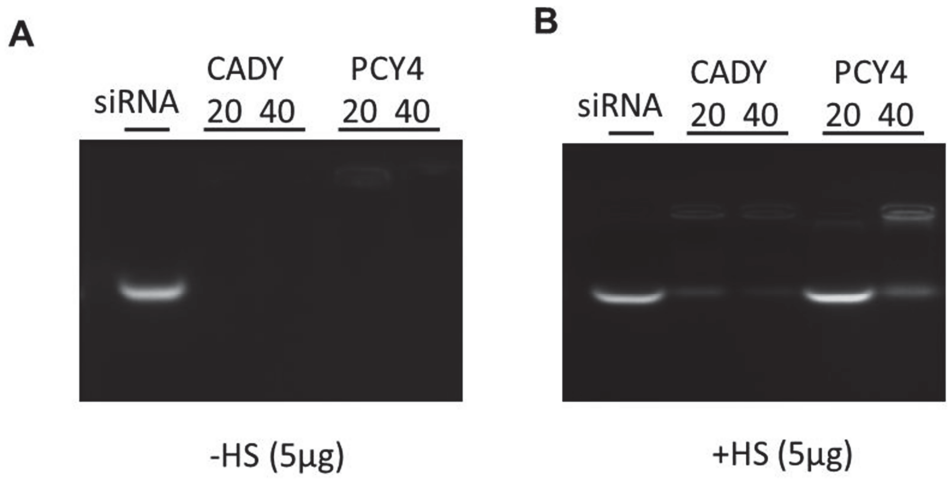


Figure 4.11 : Evaluation de la formation et de la stabilité des nanoparticules CPP/siRNA par électrophorèse sur gel d'agarose. Les complexes sont formés avec une concentration fixe de siRNA-GAPDH (0,33 pmol) à deux ratios molaires R=20 et R=40 dans une solution aqueuse à 5% de glucose. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%), puis le siRNA libre est visualisé à l'aide de l'intercalant GelRed® sous UV. Les complexes CADY/siRNA ont été comparés à ceux formés avec PCY4 en absence (**A**) et en présence (**B**) de 5 µg d'héparane sulfate (HS).

En revanche, comme décrit précédemment, la présence d'HS déstabilise très peu les interactions entre CADY et le siRNA quel que soit le ratio (R=20 ou R=40) utilisé. On observe une proportion très faible du siRNA sous forme libre comparé au contrôle du siRNA seul (25 à 10% selon le ratio ; cf. CHAPITRE 3, § 4.1.2.). Par contre les nanoparticules formées avec PCY4 sont plus facilement déstabilisée par l'HS, car on observe une bande du siRNA plus intense que pour CADY et ce pour les deux ratios étudiés. Pour un ratio R=20, nous retrouvons une bande de la même intensité que celle du siRNA seul, alors que pour R=40, le complexe n'est que partiellement déstabilisé (bande de plus faible intensité, ~40%). Donc, comme pour tous les CPPs de cette étude, augmenter le nombre de peptides par siRNA permet une meilleure

protection contre des agents déstabilisants tels que l'HS. Toutefois les nanoparticules CADY/siRNA sont moins sensibles à la présence d'HS et donc plus stables que celles formées avec PCY4.

4.3 Évaluation des nanoparticules PCY4/siRNA *in cellulo* et *in vivo*

Bien que les caractères physico-chimiques des nanoparticules PCY4/siRNA soient moins adéquats que ceux de CADY/siRNA, nous avons analysé les deux types de complexes *in cellulo*. Les premiers tests cellulaires effectués par le Dr. M. Lindberg ont révélé une activité comparable, voire supérieure, de PCY4/siRNA-Luc à réduire l'expression de la luciférase dans des cellules neuronales (Neuro-2A-Luc+) en comparaison à celle induite par les particules formées avec CADY (résultats non montrés).

Encouragés par ces résultats, les premiers essais *ex vivo* ont été effectués par le Dr. C. Jourdan afin d'évaluer la capacité du peptide PCY4 à véhiculer des molécules d'intérêt thérapeutique de type siRNA dans le tissu cible (cerveau). Nous avons tout d'abord voulu déterminer si les complexes PCY4/siRNA et CADY/siRNA pouvaient pénétrer dans les neurones et si oui, atteindre une population cellulaire particulière. Pour cela, nous avons utilisé des tranches de cerveau de souris maintenues vivantes, que nous avons incubées avec des nanoparticules CADY/siRNA-Cy3 et PCY4/siRNA-Cy3 (Cy3 = Cyanine-3). Dans les deux cas, nous avons observé un faible signal de fluorescence du siRNA vectorisé par CADY (résultat non-montré) ou par PCY4 dans le cytoplasme des neurones (Figure 4.12). Cependant, à l'exception d'une accumulation plus importante des siRNAs dans les ventricules, PCY4 ne semble pas avoir plus de spécificité que CADY dans le transfert du siRNA au niveau des cellules neuronales.

Suite à ces expériences préliminaires, nous avons évalué la capacité des complexes à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) chez la souris, suite à une administration des complexes CADY/siRNA et PCY4/siRNA par voie intraveineuse. Une heure après l'administration des complexes, les souris ont été sacrifiées puis les différents organes ont été prélevés et analysés. Malheureusement, quel que soit le

peptide vecteur, aucun siRNA n'a été retrouvé dans le cerveau des animaux traités. En analysant les autres organes, nous avons pu observer que les complexes étaient principalement retrouvés dans le foie, la rate, les reins et les poumons, suggérant une élimination « classique » des xénobiotiques par l'organisme (résultats non-montrés).

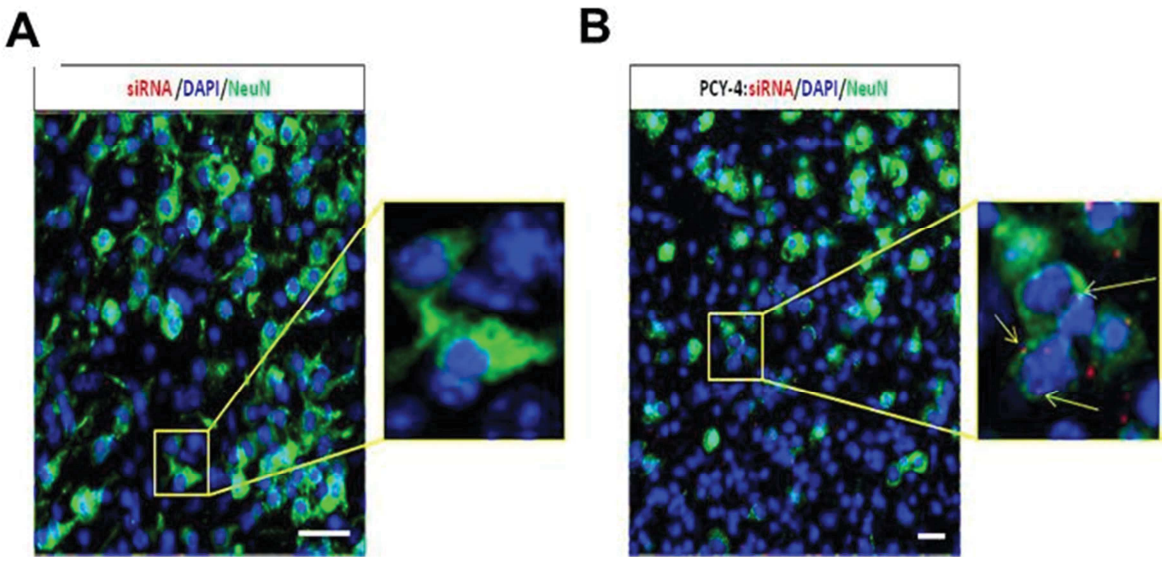


Figure 4.12 : PCY4 permet l'internalisation de siRNA dans les neurones. Images confocales (ZEISS, LSM780, objective x40) de tranches de cerveau de souris après immunomarquage (rouge: siRNA-cy3, bleu: DAPI, vert: anticorps NeuN pour le marquage des neurones). Des tranches vivantes de cerveau de souris adultes (300 µm) ont été incubées avec 10 nM siRNA **(A)** ou avec PCY4/(10nM)siRNA (ratio 20/1) **(B)** pendant une heure dans une solution d'aCSF (*artificial CerebroSpinal Fluid*). Après lavage, les tranches ont été fixées au PFA 4% puis immuno-marquées. Les siRNA sont retrouvés dans les neurones (dans le cytoplasme et le noyau, flèche dans le panel de droite) seulement quand ils sont formulés avec PCY4. Echelle: 20 µm.

La BHE étant le principal obstacle à la pénétration des complexes dans le cerveau, nous avons essayé de la contourner en administrant des complexes concentrés par voie intranasale (également connue pour permettre un passage dans le cerveau). Cependant, de la même manière que par voie intraveineuse, aucune des formulations testées n'a pour l'instant permis de visualiser du siRNA dans le cerveau.

5. PEGylation de CADY pour augmenter la demi-vie des nanoparticules CADY/siRNA

Lors d'une administration *in vivo* (par exemple en intraveineux) des nanoparticules CADY/siRNA, celles-ci sont en contact direct avec les constituants biologiques sanguins. Afin de réduire ces interactions et d'augmenter la circulation sanguine des nanoparticules, nous avons voulu créer une barrière hydrophile sur la zone externe des complexes en greffant un motif de polyéthylène glycol (PEG) sur le peptide CADY. Les PEG sont des unités répétitives d'oxyde d'éthylène chimiquement inertes et la PEGylation est un processus par lequel le PEG est conjugué à des protéines, des peptides ou des molécules thérapeutiques. Les PEGs sont des polymères caractérisés par leurs propriétés hydrophiles, peu immunogènes et peu toxiques (266). Grâce à leurs biocompatibilités la FDA a approuvée leurs utilisations dans des essais cliniques. En 1990, la FDA américaine a approuvé la première protéine thérapeutique PEGylée qui est commercialisée sous le nom de marque d'Adagen (pegadamase), par la société Enzon Pharmaceuticals pour le traitement de l'immunodéficience sévère combinée (SCID pour *severe combined immunodeficiency*) (267).

Les substances actives conjuguées ou les nanoparticules fonctionnalisées avec un motif PEG sont décrits comme des systèmes de délivrance à circulation prolongée avec un fort potentiel dans des applications d'administration systémique (242). En effet, les PEGs, qu'ils soient adsorbés ou liés de manière covalente, crée une barrière stérique empêchant les interactions avec les protéines sériques et leurs reconnaissance par le système immunitaire (247,268,269). La durée de vie des molécules PEGylées ainsi prolongée dans l'organisme augmente le temps de contact de l'agent thérapeutique avec le tissu cible.

Dans ce contexte, nous avons conçu le peptide CPEG (CADY PEGylé). Pour cela, nous avons utilisé une séquence de CADY plus courte (CADY-K, 19mer) capable de former des nanoparticules avec un siRNA (résultats non-montrés). Ensuite, nous avons introduit une fonction cystéamide sur la partie C-terminale de CADY-K afin de pouvoir y greffer l'entité PEG d'un poids moléculaire de 2 000 g/mol (PEG2000).

5.1. Versatilité structurale de CPEG

Dans un premier temps, il est important de vérifier que le motif PEG ne modifie pas les caractéristiques biophysiques de CADY. La capacité d'internalisation étant basée sur la versatilité structurale, des spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés afin de vérifier que CPEG pouvait adopter une structure en hélice alpha comme CADY.

CPEG n'adopte pas de structure particulière dans l'eau ultra pure, le spectre dichroïque est semblable à celui d'une structure non ordonnée (Figure 4.13). La structure « *random coil* » est caractérisé par un minimum à 198 nm et des valeurs d'ellipticité molaire négatives à 190 nm (235,236), mais on observe cependant un léger décalage du pic à 198 nm vers 203 nm et des valeurs d'ellipticité molaire positives à 190 nm. Comme pour CADY et PCY4, ce décalage indique que CPEG serait susceptible d'adopter une conformation plus définie.

Complexé au siRNA aux ratios molaires R=20 et R=40, les spectres de CPEG présentent les pics caractéristiques d'une hélice alpha, avec 2 minima à 207 nm et 222 nm. CPEG conserve cette conformation même en présence de LUV de DOPC/SM/Chol. L'ajout de lipides neutres n'induit pas de modification du spectre de CPEG puisque les spectres au ratio molaire lipide/peptide r=5 et r=10 se superposent avec ceux du peptide complexé CPEG/siRNA (Figure 4.13).

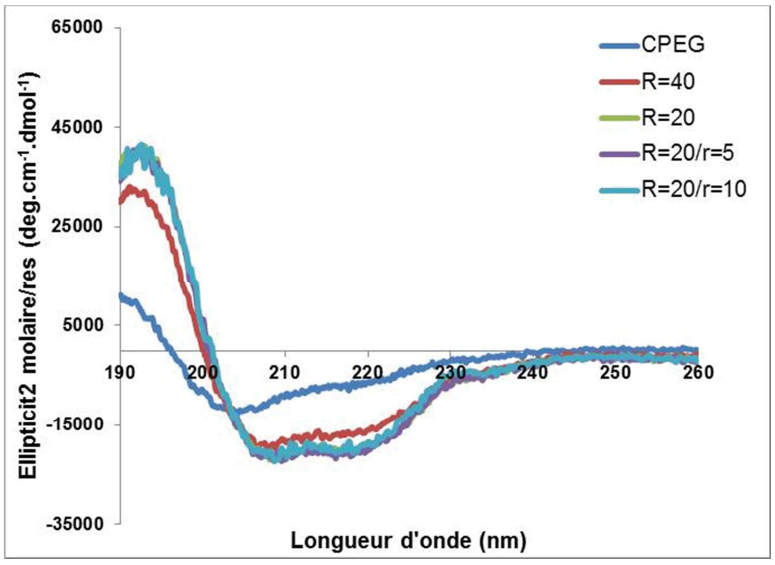


Figure 4.13: Détermination de la structure secondaire du peptide CPEG en solution dans différents environnements. Les spectres de dichroïsme circulaire sont mesurés dans l'UV-lointain, dans de l'eau ultra pure pour le peptide seul, complexé au siRNA (R=20, 40), puis mis en présence de LUV de DOPC/SM/Chol (r=5, 10) avec une concentration de peptide de 40 µM.

Ainsi le motif PEG en position C-terminale n'influence pas la conformation hélicoïdale du peptide en présence du siRNA qui correspond parfaitement à celle de CADY, mais l'interaction avec des lipides neutres ne renforce pas la formation de cette hélice.

5.2 Évaluation des nanoparticules CPEG/siRNA *versus* CADY/siRNA *in vitro*

Précédemment, nous avons montré par modélisation moléculaire que lors de la complexation de l'oligonucléotide, environ 13 molécules de CADY sont en interaction directe avec le siRNA formant des grains. D'autres peptides se greffent alors autour de ces grains afin de les autoassembler en structure plus grande (voir CHAPITRE 2) (259). Comme cela a été souligné lors de l'analyse des analogues de CADY, l'autoassemblage des CPP/siRNA est sensiblement dépendant de la séquence du CPP (voir CHAPITRE 3). En greffant le PEG sur CADY-K, nous avons augmenté l'hydrophilicité de la molécule ainsi que doublé son poids moléculaire (de 2523 g/mol à 4523 g/mol). Malgré la proportion importante que représente le PEG sur le CPP, il n'inhibe pas les interactions de CPEG avec le siRNA. Bien au contraire, nous pouvons mesurer par spectroscopie de fluorescence une constante de dissociation, correspond à 14 ± 10 nM, sensiblement plus forte que l'affinité de CADY/siRNA (47 ± 10 nM).

Néanmoins, le greffage du PEG en tant que motif de surface assurant ainsi la furtivité des nanoparticules, a suscité un certain nombre de questions sur l'abondance nécessaire du motif PEG. Pour répondre à cette question, nous avons fait varier les conditions de formulation de CPEG/siRNA et testé l'effet de ces formulations sur les tailles moyennes et l'IP de ces différentes nanoparticules.

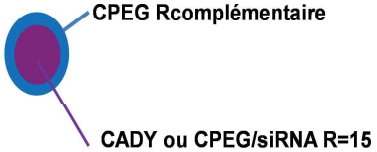
5.2.1 Caractérisation de la taille moyenne, de l'IP et de la charge de surface des nanoparticules CPEG/siRNA

Dans un premier temps, dans le but de conserver le motif PEG en surface, nous avons formulé des complexes en suivant le schéma théorique suivant (Figure 4.14 (A)): les nanoparticules de CADY/siRNA ou CPEG/siRNA sont formées à un ratio molaire minimum de R=15 pour initier les grains auxquels on ajoute des quantités croissantes de CPEG correspondant à un ratio complémentaire (Rc) et obtenir au final un ratio de 40 (R=15 + Rc=25) (Figure 4.14 (B)).

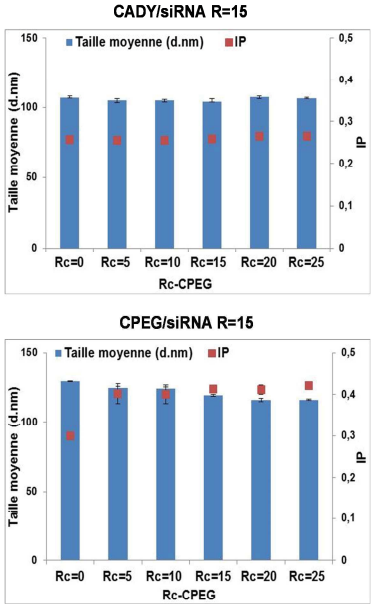
Les nanoparticules formées avec un cœur CADY ou CPEG (R=15, Rc=0) restent stables et homogènes, même après titration avec du CPEG jusqu'aux ratios Rc=25 (correspondant à un ratio final de 40). En général, on observe des tailles moyennes d'environ 105 nm et de 130 nm ainsi que des IP entre 0,26 et 0,40 respectivement pour CPEG/(CADY/siRNA) et CPEG/(CPEG/siRNA) (Figure 4.14 (B)). Seulement pour CPEG/siRNA on observe une légère différence de l'IP entre Rc=0 et Rc=5-25 (IP=0,3 *versus* IP=0,4) qui pourrait provenir d'un encombrement stérique dû au PEG.

Les potentiels zêta indiquent que pour Rc=0, les particules CADY/siRNA et CPEG/siRNA ne possèdent pas les mêmes charges de surface qui sont alors respectivement de 39,4 ± 1,0 mV et 14,2 ± 0,3 mV (Figure 4.14 (C)). La faible valeur de potentiel zêta pour les particules de CPEG/siRNA est due à la modification de la surface par le PEG qui, en la masquant, donne une charge globalement plus faible. En revanche, cette valeur est comprise dans la zone d'instabilité définie dans les standards entre +30 mV et -30 mV (233) dans laquelle des phénomènes d'agrégation sont possibles (cf. CHAPITRE 6, Tableau 6.2). La diminution de la stabilisation électrostatique est contrebalancée par un phénomène stérique. En effet, les bras de polymère empêchent le rapprochement des particules entre elles, annihilant tout processus d'agrégation. Cependant, on peut remarquer que l'ajout supplémentaire de CPEG ne contribue pas à la modification du potentiel zêta, les valeurs enregistrées à Rc=25 étant dans la même gamme que celles obtenues à Rc=0 (37,4 ± 0,6 mV pour CPEG/(CADY/siRNA) et 19,0 ± 0,4 mV pour CPEG/(CPEG/siRNA)). Des résultats similaires avaient été montrés dans le CHAPITRE 2 : à partir du ratio molaire R=20 et pour les ratios supérieurs, la taille moyenne et le potentiel zêta des nanoparticules CADY/siRNA restent stables (259).

A



B



C

R=15	Rc (CPEG)	PZ (mV)
CADY	0	39,4 ± 1,0
	25	37,4 ± 0,6
CPEG	0	14,2 ± 0,3
	25	19,0 ± 0,4

D

R=40	Taille moyenne (d.nm)	IP	PZ (mV)
CADY	124,9 ± 0,5	0,285 ± 0,008	45,4 ± 1,4
CPEG	102,3 ± 1,9	0,365 ± 0,008	20,9 ± 0,8
CPEG PBS 0,5X	99,5 ± 2,1	0,365 ± 0,010	-
CPEG/siRNa 154mM NaCl	108,8 ± 0,3	0,239 ± 0,003	-

Figure 4.14 : Evaluation de la taille et du potentiel zêta de formulations avec CPEG. (A) Schéma des complexes CADY/siRNA ou CPEG/siRNA préformés à un ratio R=15 puis complétés par une couche de CPEG à un ratio molaire complémentaire Rc. **(B)** Taille moyenne et IP de CADY/siRNA-GAPDH et CPEG/siRNA-GAPDH formulés à R=15 puis titrés avec CPEG avec des ratios molaires complémentaires de Rc=0, 5, 10, 15, 20 et 25. **(C)** Potentiel zêta de ces formulations à Rc=0 et R=25. **(D)** CADY/siRNA-GAPDH dans 5% de glucose-5 mM de NaCl est comparé à CPEG/siRNA-CyclineB1 à R=40 dans 5% de glucose-5 mM de NaCl, PBS 0,5X et 154 mM NaCl. Les mesures de DLS sont obtenues à des concentrations en peptide de 25 µM.

Au travers de ces résultats, on constate que des nanoparticules uniquement constituées de CPEG peuvent se former avec des tailles équivalentes aux nanoparticules CADY/siRNA. Lorsque l'on compare les deux types de particules directement formulées à un ratio R=40 dans une solution aqueuse à 5% de glucose-5 mM de NaCl, les valeurs des tailles moyennes obtenues (124,9 ± 0,5 nm pour CADY/siRNA et 102,3 ± 1,9 nm pour CPEG/siRNA) ainsi les IP (0,285 ± 0,008 pour CADY/siRNA et 0,365 ± 0,008 pour CPEG/siRNA) ne sont pas significativement différentes (Figure 4.14 (D)). Les valeurs correspondent globalement aux moyennes

observées pour les nanoparticules CADY/siRNA avec une taille moyenne de 106 ± 30 nm et un IP de 0,357 ± 0,053 (cf. CHAPITRE 5, § 3). Par contre, les deux types de particules se différencient par leur potentiel zêta, dont la valeur est réduite en présence de PEG.

Finalement, les tailles des nanoparticules CPEG/siRNA ont été évaluées dans des environnements à force ioniques élevés, notamment à PBS à 0,5X et à 150 mM de NaCl. A l'inverse des complexes CADY/siRNA (CHAPITRE 4, § 2.1), les tailles moyennes enregistrées pour CPEG/siRNA dans ces milieux n'augmentent pas de manière drastique. On n'observe pas de phénomène d'agrégation et les tailles moyennes conservent des valeurs proches de celles obtenues dans un milieu standard à 5% de glucose-5 mM de NaCl, soit respectivement 99,5 ± 2,1 nm et 108,8 ± 0,3 nm dans des solutions de PBS à 0,5X ou de NaCl à 154 mM.

L'ajout du PEG permet donc de formuler des nanoparticules stables et homogènes même dans une solution à force ionique élevée, ce qui peut présenter l'avantage de se rapprocher de conditions physiologiques compatibles avec des applications *in cellulo* ou *in vivo*.

5.2.2 Evaluation de la stabilité des nanoparticules CPEG/siRNA

Pour terminer, la stabilité des nanoparticules CPEG/siRNA a été étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose aux ratios molaires R=20 et R=40 (Figure 4.15).

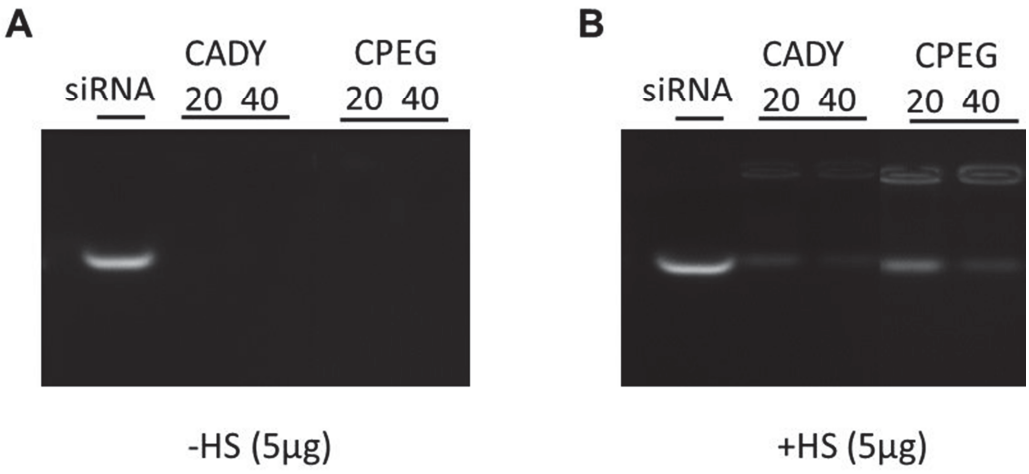


Figure 4.15 : Evaluation de la formation et de la stabilité des nanoparticules CPEG/siRNA par électrophorèse sur gel d'agarose. Les complexes sont formés avec une concentration fixe de siRNA (0,33 pmol) à deux ratios molaires R=20 et R=40 dans une solution aqueuse à 5% de glucose. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%), puis le siRNA libre est visualisé à l'aide de l'intercalant GelRed® sous UV. Les complexes CADY/siRNA sont comparés à ceux formés avec CPEG en absence de traitement (**A**) et suite à une incubation de 30 minutes avec 5 µg d'héparane sulfate (HS) (**B**).

En l'absence d'HS (-HS), CPEG encapsule le siRNA de la même manière que CADY. Aucune bande de siRNA libre, signe de dissociation de la particule, n'est alors visible dans le gel. En revanche en présence d'HS (+HS), des bandes de siRNA libre sont observées pour les deux peptides, aux deux ratios étudiés. Cependant, l'intensité des bandes reste relativement faible comparée à celle du siRNA seul. CPEG semble être légèrement plus sensible à l'HS puisqu'à R=20, la bande de siRNA décomplexé est plus intense (~40%) que celle issue des complexes de CADY (~25%) (Figure 4.15).

5.3 Évaluation des nanoparticules CPEG/siRNA *in cellulo*

Au cours des paragraphes précédents, nous avons pu confirmer la formation de nanoparticules CPEG/siRNA stables et homogènes. La caractérisation physico-chimique de CPEG/siRNA *versus* CADY/siRNA ne montre pas de différences significatives entre les deux complexes, ce qui laisse supposer que le motif PEG, de par son hydrophilie, se place spontanément à l'extérieur de la particule. Cette hypothèse semble être confirmée par un potentiel zêta différent entre les deux complexes, indiquant un changement ou une modification de la charge de surface. Nous avons donc cherché à comprendre si ce changement de surface de la nanoparticule, en chimie et en charge, pouvait influencer l'activité de transfection.

Les particules CPEG/siRNA-Luc ont donc été testées sur le modèle cellulaire de mélanome murin B16 transfecté de manière stable avec un plasmide codant pour le gène de la luciférase (B16-Luc+).

Dans le but de comparer l'efficacité de transfection des nanoparticules de CPEG à CADY, les complexes ont été déposés sur des cellules B16-Luc+ à un ratio R=40 et

avec différentes concentrations de siRNA-Luc (20, 40 et 80 nM) (Figure 4.16). Les deux types de nanoparticules - CADY/siRNA-Luc et CPEG/siRNA-Luc - montrent une efficacité proportionnelle à la quantité de complexes déposés, les « *knock-down* » étant d'environ 40%, 65% et 70% respectivement pour 20, 40 et 80 nM de siRNA-Luc. De plus, cette diminution d'activité luciférase n'est associée à aucune cytotoxicité pour les concentrations de 20 et 40 nM de siRNA, les valeurs de toxicité obtenues étant inférieures à celles des cellules non-traitées pour les deux CPPs. A 80 nM de siRNA, on observe une faible cytotoxicité car les valeurs sont légèrement supérieures à celles des cellules non traitées mais elles restent en dessous de 20%.

Ces premiers résultats obtenus avec CPEG sont très encourageants, puisqu'ils montrent que le motif PEG ne perturbe ni la versatilité structurale de CADY, ni son affinité pour le siRNA et ni la stabilité des complexes qu'il forme avec ce dernier. De plus, ses caractéristiques colloïdales sous forme de nanoparticules sont nettement améliorées puisque les complexes CPEG/siRNA ne s'agrègent pas aux fortes concentrations en sel et semblent moins sensibles aux ions phosphates du PBS. Pour conclure, CPEG/siRNA conserve une efficacité de transfection équivalente à CADY/siRNA.

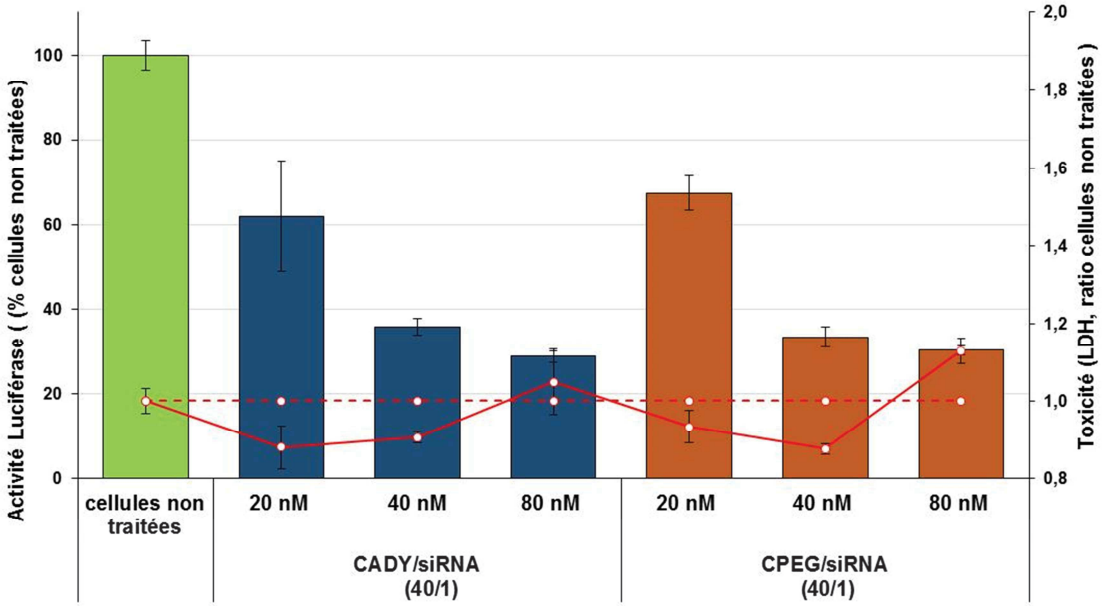


Figure 4.16 : **Evaluation de l'efficacité de transfection et de la toxicité de CPEG/siRNA versus CADY/siRNA**. Les complexes sont testés à différentes concentrations de siRNA-Luc (20, 40 et 80 nM) sur des cellules de mélanome murin B16-Luc+ à un ratio molaire R=40.

Pour chaque condition, l'activité de la luciférase est déterminée par luminométrie et la toxicité est mesurée à l'aide d'un kit LDH. Le graphique représente la moyenne et les écarts-types de trois mesures indépendantes (n=3).

6. Conclusions

Les essais d'adaptation de la formulation de CADY/siRNA à des applications *in cellulo* ou *in vivo* ont abouti à poser les bases d'un protocole standard. Ce protocole réuni toutes les étapes nécessaires pour obtenir des nanoparticules stables et homogènes afin de permettre une reproductibilité maximale des réponses biologiques. La première étape a été de déterminer les milieux préservant l'intégrité de nos complexes CADY/siRNA. La condition « 5% de glucose », compatible tant *in cellulo* qu'*in vivo,* a été choisie pour formuler les particules CADY/siRNA. Dans le souci d'améliorer l'homogénéité des particules en suspension et de stabiliser leurs propriétés dans le temps, des étapes d'extrusion et de lyophilisation ont été introduites. Finalement, le protocole standardisé comprend globalement : i) la formulation dans 5% de glucose des nanoparticules de CADY/siRNA à R>20 et une concentration de peptide de 25 à 80µM, ii) l'extrusion et iii) la lyophilisation. Les nanoparticules ainsi obtenues transfectent les cellules aussi efficacement que des nanoparticules fraichement formulées sans toxicité supplémentaire. Nous souhaitons donc pour la suite généraliser ce protocole à tous les CPPs développés dans l'équipe.

Dans un second temps, nous avons développé des peptides conservant la séquence primaire de CADY sur laquelle ont été greffés des motifs de ciblage (YIGSR-S) et de biodisponibilité (PEG). Ces motifs de natures différentes permettent au peptide de conserver quelques caractéristiques physico-chimiques de CADY telles que la versatilité structurale, l'affinité pour le siRNA ou la taille des particules obtenues.

PCY4 a été développé pour cibler le cerveau, les tests *in cellulo* et par administration directe sur des tranches de cerveau semblent prometteurs. Les images de microscopie confocale ont montré l'internalisation du siRNA marqué par le fluorochrome cyanin-3 (Cy3) suite à l'internalisation avec PCY4. Toutefois, les essais d'administration par voie systémique n'ont pas permis de détecter de siRNA dans le

cerveau de souris. Le fragment YIGSRS-S ne semble pas adapté pour atteindre le cerveau cependant l'élimination rapide des particules PCY4/siRNA peut limiter le temps de contact avec les récepteurs ciblés et par conséquent le potentiel passage de la BHE. Ce qui pose la question de l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques des nanoparticules. Pour cela, nous avons développé en parallèle CPEG en greffant un motif PEG en C-terminal de la séquence de CADY pour augmenter la biodisponibilité dans le cadre d'une administration systémique. Le PEG confère de nouvelles propriétés aux particules CPEG/siRNA et les rendent moins sensibles à leur environnement. Il permet un « *knock-down* » important de la luciférase au cours de tests d'internalisation de cellules B16-Luc+ (65% avec CPEG/40 nM siRNA-Luc, sans toxicité). Il serait donc intéressant pour la suite de réaliser des essais *in vivo* pour évaluer la biodisponibilité de CPEG seul puis accompagné de la séquence de ciblage au cerveau YIGSRS-S.

CHAPITRE 5 – DISCUSSION GENERALE

A l'heure actuelle, de nombreuses techniques sont développées pour transporter des molécules thérapeutiques de différentes natures dans les cellules. Certaines techniques comme la microinjection, l'électroporation et le canon à ADN consistent à transférer directement des molécules dans les cellules ou dans les tissus. D'autres techniques sont basées sur l'utilisation de vecteurs favorisant la protection des substances actives et leur transfert à travers les membranes cellulaires. Il existe plusieurs types de vecteurs : les virus transformés, les liposomes, les peptides vecteurs, les polymères organiques, les dendrimères et autres particules provenant des nanotechnologies. Tous les systèmes de vectorisation cités montrent une certaine activité *in vitro* et ont parfois conduit à de véritables succès *in vivo* (270–272).

En ce qui concerne les peptides vecteurs, ils ont été très largement développés pour le transport d'acides nucléiques, de protéines, de peptides, de PNA et d'autres molécules organiques. Bien que de nombreux CPPs soient relativement efficaces *in cellulo*, beaucoup d'entre eux doivent être optimisés afin d'obtenir un système de délivrance spécifique pour un type cellulaire ou tissulaire et adaptés à une utilisation *in vivo* en vue d'une application clinique. Dans le cadre d'une thérapie par administration systémique, il s'agit d'augmenter la circulation du vecteur dans l'organisme sans qu'il soit dégradé ou excrété et ce sans stimuler une réponse immunitaire. De plus le vecteur doit atteindre des sites spécifiques à la maladie pour réduire les doses à administrer et limiter les problèmes de toxicité.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse se sont focalisés autour du vecteur CADY. Ce peptide vecteur est capable de se structurer en présence d'oligonucléotides ou de lipides en une hélice alpha composée de trois zones fonctionnelles, ce qui le classe dans la catégorie des peptides amphipathiques secondaires (152,153). Ces trois zones constituées essentiellement de tryptophane, d'arginine et de leucine jouent un rôle important au cours de l'autoassemblage, car suite à l'intégration d'une première couche de peptides autour d'un siRNA (~13 peptides) *via* des interactions électrostatiques avec les arginines, une seconde

couche s'y associe, maintenue par des interactions intermoléculaires hydrophobes peptide/peptide *via* les leucines (259). Les résultats obtenus par modélisation « *I-Tasser* » (CHAPITRE 3, § 4.2) indiquent que la conformation de CADY en hélice alpha serait stabilisée par trois interactions de type π-*cation* (entre tryptophane et arginine) et une de type π-*stacking* (entre tryptophane et tryptophane) Ces résultats concordent avec ceux obtenus par le logiciel « *PepLook* » montrant une conformation en hélice alpha initiée par le fragment central R^8LLR^{11} (153).

Notre objectif primaire était d'explorer les pistes d'optimisation du peptide vecteur CADY afin d'en faire un agent de délivrance de siRNA performant pour une application *in vivo* thérapeutique. Notre étude a donc consisté à poser les bases de nos formulations en termes de synthèse et conception de vecteur, de formation et de caractérisation des complexes, de stabilité des formulations et de toxicité dans le but d'atteindre une efficacité significative *in vivo*. Pour cela, les propriétés de CADY ont été contrôlées après modification dans sa séquence primaire, conjugaison à des motifs fonctionnels et stabilisation sous forme de nanoparticules.

1. Formulation de CADY/siRNA

CADY est un peptide vecteur amphipathique développé spécifiquement pour la délivrance de siRNA. Il résulte de plusieurs mutations au sein du peptide vecteur ppTG1, un variant du peptide de fusion JTS-1, connu pour son activité déstabilisatrice de membrane cellulaire (218). CADY est capable de former des nanoparticules stables avec des siRNAs, qui peuvent être utilisées pour la transfection de différentes lignées cellulaires ainsi que pour des cellules dites « difficiles à transfecter » (152,259,273).

Tout au long du manuscrit, plusieurs siRNAs ciblant les protéines cycline B1, GAPDH et luciférase ont été utilisés en combinaison avec CADY, sans différence notoire dans la taille moyenne des particules formées. Si les séquences sont différentes, ces siRNAs sont tous composés de 21 nucléotides (21mers), portant ainsi le nombre de charges négatives à 42 pour chaque oligonucléotide. Crowet et coll. ont montré par modélisation moléculaire que les interactions entre CPPs et siRNAs sont basées sur la capacité des arginines à interagir avec les groupements phosphates du siRNA par

interaction électrostatique (228). Ceci laisse supposer que les interactions CPPs/siRNA sont indépendantes de la séquence du siRNA. Seules les caractéristiques du peptide (distribution des charges positives, degré d'amphipathicité, etc.) peuvent moduler l'interaction avec les phosphates du siRNA. Les constantes d'affinité obtenues avec les différents analogues de CADY (CHAPITRE 3) vont d'ailleurs dans ce sens. D'autre part, les nanoparticules ont aussi été formées avec des siRNAs marqués avec différentes sondes fluorescentes (FITC, Cy3 ou Cy5). Toutefois, il est important de noter que l'ajout d'une sonde fluorescente n'affecte ni la formation des particules, ni leurs tailles (100 ± 20 nm, résultats non montrés).

Ces quelques considérations suggèrent que les résultats obtenus au cours de la caractérisation biophysique des nanoparticules CPP/siRNA sont liés aux différents CPPs mis en œuvre plutôt qu'à la séquence des siRNAs, suggérant que ces derniers peuvent être utilisés indifféremment. L'analyse des analogues de CADY sous forme complexée a donc été effectuée sans tenir compte du siRNA rattaché (GAPDH, luciférase, cycline B1, avec ou sans sonde fluorescente).

2. Les analogues de CADY

Au sein de l'équipe, nous avons développé six analogues du vecteur CADY (PSW, PSF1, PSF2, PSF3, PG9 et PG16) dans le but de comprendre l'importance de certains résidus et de pouvoir améliorer sa séquence et ainsi son efficacité. Ces analogues ne contiennent pas de fonction cystéamide, [Cya], en position C-terminale, car nous avons pu montrer que CADY/siRNA forme des nanoparticules de tailles similaires (~100 nm) et d'efficacités de transfection comparables (test de « *knock down* » de luciférase) en présence ou en l'absence de cette fonction. Ceci est confirmé par des résultats de modélisation moléculaire montrant que le cystéamide ne participe pas à la construction du complexe CADY/siRNA (228). De plus, notre idée de concevoir des nanoparticules à base de peptides vecteurs sans cystéamide a été confortée par le fait que plusieurs autres groupes scientifiques ont développé des CPPs sans cette fonction, par exemple ceux de la famille PepFect (127,274), CHOL-R9 (275) ou C6M1 (276).

Les premiers analogues de CADY ont été mutés au niveau des résidus W, résidus décrits pour leur rôle central dans les interactions avec les lipides *via* leur noyau indole (277–279). Les autres analogues ont été modifiés au sein du fragment R^8LLR^{11} initiant la formation hélicoïdale du peptide (153) ou dans la partie C-terminale afin de changer les propriétés d'hydrophobicité du vecteur. En analysant les projections hélicoïdales obtenues par le logiciel « *Helical Wheel* » et les modèles générés par « *I-Tasser* », l'hélice alpha constitue la structure secondaire privilégiée par l'ensemble des analogues avec un caractère amphipathique prononcé, c'est-à-dire exhibant les trois zones comportant les résidus W, L et R. Seul PG9, avec une alanine dans le fragment R^8LLR^{11} et un segment équivalent à un NLS en C-terminale, se différencie de ce schéma avec une séparation moins franche des zones fonctionnelles.

Néanmoins, malgré de fortes similarités entre la séquence primaire, la structure secondaire hélicoïdale et l'amphipathicité des analogues, nous avons observé d'importantes différences de solubilisation, notamment pour les peptides PSF1, PSF2, PSF3 et PSW qui se sont révélés extrêmement peu solubles dans l'eau. En effet, PSF1, PSF2 et PSF3 possèdent un caractère hydrophobe prononcé qui peut être directement corrélé à leur faible solubilité. De plus, ces CPPs ont une faible affinité pour le siRNA. Or, Crowet et coll. ont montré en dynamique moléculaire que l'affinité de CADY pour le siRNA passait par des interactions électrostatiques impliquant les arginines (53-75% des contacts) mais aussi par des liaisons hydrogènes impliquant les noyaux indoles du tryptophane (9-20% des contacts) (228). Ces liaisons hydrogènes sont précisément le type d'interactions abolies par le remplacement des tryptophanes (W) par des résidus phénylalanines (F). Une approche identique par modélisation ou une analyse expérimentale par RMN pourrait mettre en évidence cette diminution d'affinité, associée à la substitution des W par des F. Lorsque l'on ajoute un W comme c'est le cas pour PSW, l'affinité pour le siRNA est comparable à celle de CADY (67 ± 43 nM pour PSW/siRNA *vs* 47 ± 10 nM pour CADY/siRNA). L'affinité n'est pas forcément meilleure avec PSW car, comme indiqué précédemment pour CADY, les liaisons W/siRNA représentent une proportion faible des contacts existants avec le peptide. Cependant, malgré un caractère plutôt hydrophile (coefficient GRAVY de -0,060), PSW est également peu soluble dans un milieu aqueux.

Etant donné que la solubilité en milieu aqueux est un critère essentiel pour l'exploitation d'un peptide vecteur (276), les peptides PSF1, PSF2, PSF3 et PSW n'ont pas été sélectionnés pour la suite de ce travail. Nous n'avons donc pas pu évaluer l'effet des substitutions W→F ou l'ajout d'un W sur l'interaction des CPPs avec des lipides mimant la membrane plasmique. L'intérêt de ces analogues était de valider le rôle du résidu tryptophane mais aussi de son positionnement sur la séquence primaire. Toutefois d'autres auteurs ont essayé de déterminer le rôle précis de ce résidu dans le mécanisme d'internalisation des CPPs (280–282). Par exemple Jobin et coll., dans une approche similaire, ont pu vérifier cette influence en remplaçant les W du peptide vecteur de 9 résidus RW9 par des F à différentes positions. Leur étude a montré que trois résidus W étaient suffisants pour l'internalisation et que le mutant équivalent en F s'accumulait à la membrane sans être internalisé (283).

Les peptides sélectionnés pour l'analyse comparative, PG9 et PG16, sont deux peptides amphipathiques secondaires très solubles affichant une bonne affinité pour les siRNAs (77 nM et 131 nM, respectivement). Les deux analogues forment, en complexant les siRNAs, des nanoparticules d'environ 110 nm dans l'eau ultra pure et de 158 nm dans 5mM de NaCl, similaires aux particules de CADY/siRNA (125 nm et 118 nm). Par ailleurs, la présence d'héparane sulfate entraîne un relargage du siRNA inférieur à 15 % (R=40) lors des tests de migration par électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui suggère que ces complexes sont également peu sensibles aux molécules compétitrices chargées négativement.

La séquence de PG9 contient, avec 5 arginines et 2 lysines, deux charges positives supplémentaires par rapport à celle de CADY. Cet excès de charges positives, surtout localisé en position C-terminale du peptide, empêche la structuration en hélice alpha de ce fragment (modèle « *I-Tasser* »). Par contre l'excès de charges n'apporte pas d'interactions supplémentaires avec le siRNA par rapport à CADY puisque les affinités pour le siRNA, les tailles moyennes des particules ainsi que la stabilité en présence d'héparane sulfate sont équivalents. Contrairement à toute attente, l'excès de charges de PG9 n'induit pas une charge de surface supérieure à celle de CADY (PZ_{PG9} ~ 30 mV *versus* PZ_{CADY} ~ 44 mV). On peut supposer que les interactions PG9/PG9 finalisant l'autoassemblage des particules et déterminant les propriétés de surface sont différentes de celle de CADY/CADY. Ceci confirme la

complexité de l'autoassemblage des nanoparticules tel qu'il est décrit dans le CHAPITRE 2, montrant qu'à ce jour les forces et/ou les conditions structurales ne sont pas totalement élucidées. Cependant, une réduction de la charge de surface telle qu'elle est observée pour les nanoparticules PG9/siRNA peut devenir un avantage. En effet cela peut les rendre moins sensibles, en particulier à des ratios molaires importants, aux HS chargés négativement qui entrent alors en compétition directe avec le siRNA dans les interactions avec les peptides vecteurs.

Contrairement à PG9, la séquence de PG16 possède seulement deux mutations et le même nombre de charges positives que CADY. Les nanoparticules PG16/siRNA présentent des propriétés similaires aux nanoparticules de CADY/siRNA, seuls leurs potentiels zêta diffèrent (PZ_{PG16} ~ 34 mV *versus* PZ_{CADY} ~ 44 mV). Ceci peut s'expliquer par les deux modèles conformationnels proposés pour PG16 par le logiciel « *I-Tasser* » : un premier modèle entièrement hélicoïdal stabilisé énergétiquement (*C-score* = -0,10) et un second modèle représentant deux segments d'hélices en N- et C-terminal (*C-score* = -2,79). Si l'on admet un équilibre entre les deux modèles, les interactions PG16/PG16 contrôlant l'autoassemblage pourraient modifier la surface des nanoparticules et par conséquent leur charge à la surface.

Globalement, ces résultats indiquent que les mutations induites dans la séquence primaire de CADY n'ont pas d'influence sur les interactions des vecteurs PG9 et PG16 avec le siRNA, qui sont basées principalement sur des interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement des peptides et les groupements phosphates des oligonucléotides. Cependant, ces mutations pourraient modifier les *patchs* hydrophiles et hydrophobes en surface des particules formées, leur conférant ainsi des caractéristiques physico-chimiques distinctes.

La compréhension du mécanisme d'internalisation des CPPs reste primordiale pour leur développement en tant qu'outil de transfection. Depuis plusieurs années, les chercheurs ont clairement mis en évidence deux modes d'internalisation pour les CPPs : les voies d'endocytose et la translocation directe (237,284,285). Ces deux modes d'entrée cellulaire dépendent d'un nombre important de paramètres dont la séquence du vecteur, la molécule à internaliser, la stratégie d'internalisation de la molécule d'intérêt (covalente ou non covalente), la concentration du CPP, la

méthode expérimentale et le type de cellules utilisées (185,286). Cependant, malgré les avancées scientifiques, il est aujourd'hui toujours difficile de corréler la séquence peptidique d'un CPP avec son mécanisme d'internalisation. Afin, d'obtenir plus d'information sur l'interaction des CPPs avec la membrane plasmique, plusieurs modèles de membranes lipidiques et méthodes d'analyses ont été mis en place telles que l'évaluation de la structure secondaire en présence de LUV (mesure en dichroïsme circulaire) et la mesure de l'insertion à l'interface eau/air (monocouches de Langmuir).

CADY est un CPP supposé internaliser sa cargaison via un processus de translocation directe à travers la membrane plasmique, grâce à son amphipathicité ainsi qu'à sa forte propension à interagir avec les lipides (153,273). Les interactions CPPs/lipides et complexes/lipides ont donc été analysées pour les analogues PG9 et PG16 en comparaison avec CADY. De nombreuses études ont montré que les interactions des CPPs, généralement cationiques, avec les lipides étaient amplifiées en présence de lipides anioniques (153,201,204,287). Cependant nous avons souhaité tester un modèle de lipide globalement neutre, plus relevant de la membrane plasmique, constitué d'un mélange de DOPC/SM/Chol sous forme de LUVs (288,289).

Tableau 5.1 : Récapitulatif des études structurales de CADY, PG16 et PG9.

CPP	CPPs seuls	CPPs seuls + LUV	CPPs complexés	CPPs complexés + LUV
CADY	-	++	+++	+++
PG16	-	++++*	+	++++*
PG9	-	-	+	+

Notes : les LUVs sont composés de DOPC/SM/Chol (40/40/20 en moles). Non structuré (-) ; Hélice alpha avec présence des pics caractéristiques (207 nm et 222 nm) à différentes amplitudes en ellipticité molaire moyenne par résidu (mdeg x cm^{-1} x $dmol^{-1}$) : faible (+), moyenne (++), forte (+++) et très forte (++++). * présence d'un pic supplémentaire à 230 nm.

Les résultats obtenus par mesure de dichroïsme circulaire résumés dans le Tableau 5.1 montrent les différentes conformations adoptées par les trois CPPs seuls ou en complexes, puis en présence de LUVs neutres. Selon ces données, les CPPs peuvent être classés suivant leur capacité à interagir avec les lipides : PG9 < CADY < PG16. Comme cela avait déjà été montré pour CADY en présence de DOPC (153), l'absence de charge sur les lipides est généralement décrite comme un facteur limitant les interactions avec les peptides (201,287) ; celui-ci est encore plus prononcé pour PG9 en présence de LUVs DOPC/SM/Chol. A l'inverse, PG16 montre une forte structuration en hélice alpha en présence de LUVs neutres, mettant en avant un pic supplémentaire à 230 nm généralement attribué aux W. En effet, ce résidu est capable de se placer à l'interface hydrophile/hydrophobe des bicouches lipidiques (278,290). Adoptant une orientation spécifique par rapport au squelette polypeptidique lié à la structuration en hélice, les W s'impliquent dans des interactions de type π-*cation/stacking* donnant naissance à ce pic à 230 nm (201,291,292). Les interactions peptides/lipides peuvent être de nature hydrophobe et/ou électrostatique (277). Dans notre cas, il semble que les interactions PG16/lipides soient de nature hydrophobe puisque le peptide est capable de se structurer en hélice alpha même en présence de lipides neutres. De plus, le point de rupture de la conformation hélicoïdale de PG16, dû à la mutation $L^9 \rightarrow G^9$, induit plus de degrés de liberté des segments situés de part et d'autre du résidu G, ce qui pourrait expliquer l'apparition d'interactions W/lipide supplémentaires.

Afin d'obtenir plus d'informations sur les interactions CPPs/lipides, nous avons comparé l'interaction des CPPs vis-à-vis des lipides anioniques (DOPG) et des lipides neutres (DOPC/SM/Chol) sur un autre modèle de membrane : le modèle de la monocouche de Langmuir. Dans un premier temps, nous avons expérimentalement vérifié l'amphipathicité de nos CPPs en évaluant leurs capacités à se placer à l'interface eau/air. L'amphipathicité quantifiée par la pression (πsat) et la concentration à laquelle les CPPs saturent l'interface (CMC) permettent de classer les vecteurs selon une amphipathicité croissante de la manière suivante : PG9 < CADY < PG16. La valeur de pression maximale d'insertion (MIP) permet, quant à elle, de classer les trois vecteurs selon leur potentiel d'interactions avec les lipides comme suit: PG9 < PG16 << CADY pour les lipides chargés et CADY < PG9 < PG16 pour les lipides neutres. On peut donc conclure que CADY est plus à même

de franchir les membranes chargées négativement, tandis que PG16 est plus efficace au contact de membranes neutres. Contrairement au modèle « *I-Tasser* », les données expérimentales de PG9 (Langmuir et CD) indiquent une moindre disposition à se structurer en hélice alpha et un caractère amphipathique moins prononcé que CADY et PG16. Donc, si PG9 est peu structuré à une interface eau/air (situation interfaciale équivalente à la zone hydrophile/hydrophobe d'un lipide) et que son amphipathicité est faible, alors sa capacité à s'adsorber peut en être altérée. Toutefois PG9 est plus amphipathique que des vecteurs tels que R9 ou Tat qui ne présentent aucune augmentation de pression même à des concentrations supérieures à 1 µM (204). A l'inverse de PG9, CADY et PG16 interagissent fortement avec les lipides et pourraient ainsi s'insérer spontanément dans des membranes lipidiques de préférence chargées. Calvez et coll. ont montré que la suppression de fragments d'hélices amphipathiques présents dans la structure des Apolipoprotéines (protéines constituées de plusieurs hélices) entraîne une diminution des MIP (241). Ces observations confirment que l'augmentation des MIP de CADY et PG16 comparé à PG9 est liée au caractère amphipathique de peptide structuré en hélice alpha et que cette propriété a une forte influence sur les interactions peptide/lipide.

Dans mes travaux, l'insertion des complexes CPP/siRNA dans des monocouches lipidiques de Langmuir n'a pas été évaluée car nous avons montré précédemment (pour CADY/siRNA) que la technique de Langmuir n'était pas adaptée pour évaluer les propriétés interfaciales des complexes. Formulées aux ratios R<60 les nanoparticules restent principalement en suspension (153). Aux ratios supérieurs, R=80, on observe une augmentation de pression. Cependant, un doute persiste quant à la possible présence résiduelle de peptide libre en solution, capable d'interagir avec l'interface indépendamment du complexe. De plus, la consolidation des particules par des interactions peptides/peptides suppose que le premier élément rencontré par la membrane plasmique sera essentiellement le peptide vecteur. Il nous a donc paru plus judicieux d'étudier uniquement le comportement du peptide en présence de lipide par la technique de Langmuir. Par contre, une évaluation plus approfondie des interactions complexes/lipides peut être envisagée par d'autres méthodes comme celle de la spectrométrie de fluorescence, la RMN ou la calorimétrie.

Finalement, l'évaluation de l'efficacité de transfection des nanoparticules CADY/siRNA-Luc indique que celles-ci sont capables d'inhiber l'expression de la luciférase dans des cellules B16-Luc+ (jusqu'à 50% de réduction avec 20 nM de siRNA-Luc). Les nanoparticules PG9/siRNA-Luc et PG16/siRNA-Luc montrent une efficacité similaire mais avec des taux de réduction de seulement 40%. Pour les trois complexes, ces taux d'inhibition de l'expression de la luciférase sont spécifiques car ils ne sont pas accompagnés de phénomènes de toxicité mesurables. Notons également que les différents complexes ont également été testés sur d'autres lignées cellulaires et que, si CADY permet le plus souvent des « *knock-downs* » supérieurs à 50% (de l'ordre de 80-90%), PG16 et PG9 voient leur efficacité maximale maintenue à 50% quelle que soit la lignée.

En conclusion, la versatilité structurale et la formation d'une hélice amphipathique sont des éléments déterminants pour les propriétés de vectorisation de nos CPPs. Il est important de souligner à quel point les mutations ponctuelles de quelques résidus peuvent modifier les propriétés structurales des peptides et leurs interactions avec les différents partenaires (siRNA, lipides). Le nombre et le bon positionnement de résidus clés tels que les tryptophanes et les résidus chargés sont aussi des éléments à prendre en compte. A ce jour, CADY reste le vecteur « *leader* » avec une séquence primaire optimale et une vectorisation efficace des siRNAs.

3. Optimisation de la formulation des nanoparticules de CADY/siRNA

Les nanoparticules de CADY/siRNA sont assimilées à un système colloïdal dont la distribution en tailles, la stabilité et la charge de surface sont des paramètres primordiaux à maitriser. Dans le but d'obtenir des solutions colloïdales de CADY/siRNA stables et reproductibles, de nombreux tests sur la formulation des nanoparticules ont été effectués, centrés principalement sur les conditions de formulation et sur l'optimisation d'étapes d'homogénéisation et de lyophilisation.

Dans l'eau ultra pure ou à force ionique faible (5 mM en NaCl), la taille moyenne des nanoparticules de CADY/siRNA (R=20) se situe autour de 150 nm avec un potentiel zêta de +45 mV (259). Ces formulations restent stables au moins 3 semaines (cf.

CHAPITRE 2). Cependant les nanoparticules doivent être stabilisées dans des conditions plus physiologiques pour être compatibles avec des applications *in cellulo* et *in vivo*.

Suite à un criblage de différents milieux de formulation (eau ultra pure, PBS, HEPES, concentrations différentes de sel et ajout d'excipients), nous recommandons aujourd'hui de formuler des nanoparticules CADY/siRNA dans les milieux suivants :

- Eau ultra pure
- HEPES (25 mM) +/- NaCl (concentration maximale de 40 mM)
- 5% de glucose +/-5 mM de NaCl dans de l'eau ultra pure

Dans ces conditions, nous n'observons pas de différences entre les tailles moyennes et les indices de polydispersité mesurés. Cependant, même dans ces conditions dites « optimales » nous pouvons observer de légèrs écarts, probablement dus à la variabilité inhérente aux matériels employés, aux solutions utilisées, aux pipettes, au mode d'agitation, à la température non contrôlée etc. Néanmoins, en rassemblant toutes les expériences indépendantes effectuées dans les mêmes conditions de milieux et de ratio molaire, nous pouvons définir une taille moyenne et un indice de polydispersité standards pour les nanoparticules CADY/siRNA (Tableau 5.2). Ces valeurs moyennes peuvent être prises comme références pour comparer toutes les autres mesures de CPP/siRNA.

Tableau 5.2 : Récapitulatif des tailles moyennes et des IPs des nanoparticules CADY/siRNA

CADY/siRNA R = 40	Eau ultra pure	5mM de NaCl	5% de glucose-5mM de NaCl
Taille moyenne (d.nm)	125 ± 42	117 ± 4	106 ± 31
IP	0,362 ± 0,089	0,282 ± 0,060	0,357 ± 0,053

Notes : n ≤ 5 mesures indépendantes.

Avec une meilleure maitrise des conditions expérimentales (préparation de la solution de peptide, sens du mélange, absence de poussières, etc.) et de l'appareillage (DLS), nous avons pu réduire les écarts et obtenir des tailles moyennes généralement inférieures à celles publiées en 2012 (259). Afin d'obtenir des nanoparticules encore plus homogènes (taille moyenne avec une plus faible variabilité et un IP < 0,3) nous avons testé des méthodes d'homogénéisation comme la filtration et l'extrusion. En parallèle, nous avons aussi analysé la possibilité de lyophiliser les nanoparticules pour un stockage prolongé dans le temps. En résumé de ce second criblage d'optimisation de formulation CADY/siRNA, nous avons défini le protocole suivant :

- Formulation des nanoparticules CADY/siRNA avec une concentration minimale de 25 µM de CADY en eau ultra pure, 5% de glucose.
- Extrusion des nanoparticules (filtre de polycarbonate avec des pores de 100 nm).
- Lyophilisation et resuspension des nanoparticules dans de l'eau ultra pure.

Dans ces conditions, comme observé par les mesures de dichroïsme circulaire, les analyses par DLS ainsi que les tests d'inhibition de luciférase *in cellulo* indiquent que les nanoparticules CADY/siRNA restent stables (complexées) et efficaces en terme d'internalisation (cf. CHAPITRE 4).

L'extrusion au travers de filtre de polycarbonate est une méthodologie qui a été développée pour obtenir des solutions homogènes de liposomes unilamellaires (293). L'adaptation de cette technique à nos nanoparticules a permis d'améliorer l'homogénéisation de leur distribution en taille. Seulement, d'un point de vue pratique, le passage à travers la membrane de l'extrudeur nécessite plus de force qu'avec les liposomes, ce qui a engendré des pertes de matériel et parfois des fuites (~ 10 % du volume total) dans l'appareillage. Afin de mieux évaluer ces pertes, il serait intéressant de pouvoir vérifier la conservation du ratio peptide/siRNA durant le processus d'homogénéisation, par exemple en formant les particules avec un siRNA marqué d'une sonde fluorescente, et en procédant à un dosage de CADY (mesure à 280 nm) et du siRNA (mesure à λ= 494 nm pour une sonde FITC) par spectroscopie

d'absorption après chaque extrusion. De plus, des méthodes automatisées pourraient permettre de réduire les pertes de matériels observées et un contrôle adapté de l'homogénéisation de nos solutions colloïdales. Par exemple la microfluidisation est une technique d'homogénéisation à haute pression qui force le passage de solutions à grande vitesse au travers d'orifices plus petits qu'à l'entrée de la chambre d'interaction. La chambre d'interaction à géométrie fixe permet une meilleure reproductibilité des résultats avec peu de passage (technologie brevetée). Comparé à d'autres techniques (à haute pression ou non), ce type d'appareillage, produit par la société Microfluidics, permet un contrôle systématique de plusieurs paramètres (taux de cisaillement, pression, température) permettant une réduction des tailles et une amélioration de l'homogénéité des préparations (294,295).

La lyophilisation est une technique couramment utilisée pour maintenir la stabilité de n'importe quel produit sous forme de poudre à resuspendre dans les conditions de concentrations et de milieux souhaités. Elle a été adaptée à des nanoparticules de toutes sortes encapsulant des principes actifs tels que des liposomes (296), des polymères (297) et des CPPs (298,299). Dans ce contexte, nous avons pu montrer que les nanoparticules CADY/siRNA formulées en présence de 5% de glucose peuvent être homogénéisées par extrusion puis stockées sous forme de lyophilisats, avant d'être resuspendus en milieu aqueux. Ces différentes étapes ne modifient ni leurs propriétés biophysiques (tailles moyennes et IPs) ni leurs effets biologiques (efficacité de transfection). De plus, nous poursuivons les essais sur la stabilité des nanoparticules sous forme de poudre et nos essais préliminaires suggèrent que celles-ci sont stables deux mois à différentes températures (4°C, 25°C ou 37°C) avec des caractéristiques physico-chimiques préservées (résultats à confirmer). En effet il existe une forte corrélation entre la température de stockage des nanoparticules et la conservation de leurs propriétés physico-chimiques. Plus la température est élevée et plus le temps probable de stockage est diminué (258). Bien entendu la détermination de ces paramètres est complètement dépendante de la nature des nanoparticules et de leurs formulations, par exemple le poids moléculaires de nanoparticules à base de polymère d'acide lactique est peu modifié après un stockage de 350 jours à 5°C tandis qu'à 37°C une rapide dégradation des polymères est observée (300).

Pour conclure, nous sommes persuadés que la standardisation des caractéristiques de nos nanoparticules est essentielle pour garantir une reproductibilité des résultats et assurer leur transfert vers l'*in vivo* en tant que produit thérapeutique.

4. Fonctionnalisation de CADY par greffage de motifs spécifiques

L'un des buts majeurs de notre équipe concerne le développement du vecteur CADY dans la perspective d'un développement pour *l'in vivo* dans le cadre du transfert de siRNA thérapeutiques. Les premiers essais *in vivo* chez la souris ont montré que les nanoparticules CADY/siRNA administrées par voie intraveineuse sont rapidement éliminées par voie hépato-rénale (résultats non-publiés). Pour contrebalancer le phénomène d'élimination, nous avons choisi d'associer un ligand spécifique au vecteur afin de permettre son accumulation dans un tissu particulier. Dans ce but, nous avons greffé sur CADY une séquence ciblant les cellules endothéliales de la barrière hémato encéphalique (=PCY4), permettant potentiellement d'induire un adressage spécifique au cerveau. Une méthode plus répandue permet de prolonger la circulation des nanoparticules dans le sang, il s'agit d'ajouter un motif poly-éthylène-glycol (PEG) sur CADY (=CPEG) afin de limiter leur prise en charge par les processus d'élimination ou d'activation du système immunitaire.

Ces deux nouvelles molécules ont permis d'analyser l'effet de ces greffages sur la formulation des nanoparticules CPEG/siRNA et PCY4/siRNA.

Greffage d'une séquence d'amarrage à la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) peut être définie comme une barrière physiologique entre le système nerveux central et la circulation sanguine. Elle représente un filtre extrêmement sélectif, permettant d'isoler le cerveau de substances indésirables présentes dans le sang. Cependant le rôle de protection de la BHE constitue également une limitation pour certains traitements thérapeutiques. En effet, les jonctions serrées entre les cellules endothéliales de la BHE la rendent

imperméable aux macromolécules thérapeutiques. De plus, elles possèdent peu de vésicules de pinocytoses nécessaire à l'induction du phénomène d'endocytose pour ces molécules (301,302). De nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzeimer, de parkinson) ou les tumeurs du cerveau nécessite donc un traitement capable d'atteindre le système nerveux central. Dans ce contexte, le passage de la BHE est devenu un véritable challenge dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques. L'utilisation de CPPs est une alternative prometteuse dans ce domaine. Par exemple, plusieurs études soulignent le potentiel du peptide Tat à transporter des acides nucléiques, des protéines, des substances actives de bas poids moléculaire ou des nanoparticules au cerveau (303,304). Cependant le manque de spécificité des CPPs implique l'ajout d'un ligand pour une meilleure spécificité de transfection (305,306).

Pour faciliter le passage de la BHE, nous avons développé le vecteur PCY4 qui correspond à la séquence de CADY-K sur laquelle a été greffée une séquence de ciblage (YIGSR-S) spécifique des récepteurs de la laminine. Sachant que ces récepteurs sont fortement exprimés par les cellules endothéliales et les cellules de glioblastomes (260,307), nous avons émis l'hypothèse que cette séquence de greffage pouvait permettre l'amarrage des nanoparticules à la surface de l'endothélium, puis faciliter le passage de la BHE et atteindre le cerveau. La présence du fragment d'adressage YIGSR-S apporte un caractère plus hydrophile (par son résidu chargé, R, et ses résidus polaires, S) à PCY4 contribuant à modifier ses propriétés biophysiques comparé à CADY (Tableau 5.3). Si les affinités et interactions avec les siRNAs semblent conservées (taille des particules et structure hélicoïdale similaire à CADY/siRNA), la stabilité des particules formées ainsi que les interactions avec les lipides se révèlent un peu plus faibles qu'avec CADY.

Les premiers résultats *in cellulo* effectués sur des cellules de neuroblastomes murins exprimant la luciférase (Neuro-2A-Luc+) ont montré une efficacité de transfection des siRNA par PCY4 équivalente voire supérieure à celle obtenue avec CADY/siRNA (résultats non-montrés). Cependant, les résultats obtenus par administration intraveineuse sont mitigés et laissent supposer qu'une élimination rapide freine l'accumulation des nanoparticules PCY4/siRNA dans le cerveau (résultats similaires observés pour CADY/siRNA). Des observations similaires ont été faites lors d'une administration par voie intra-nasale alors que cette voie représente en général une

alternative intéressante pour atteindre le cerveau comparée aux modes d'administration invasifs (ex. intracérébrale) ou par voie systémique (308,309). Pour la suite de ce travail, il serait donc intéressant de trouver une nouvelle cible pour un adressage spécifique du cerveau, quelques pistes seront présentées dans le paragraphe des perspectives (§ 6).

Tableau 5.3 : Récapitulatif des propriétés des nanoparticules formulées avec les peptides de fonctionnalisation PCY4 et CPEG en comparaison avec CADY/siRNA

Analyses	CADY	PCY4	CPEG
Interaction siRNA	+	+	+
Kd	~ 47	nd	~ 14
Interaction HS	+	+/-	+
Taille NP*	~ 106	~ 97	~ 102
Charge NP*	~ 44	nd	~ 21
Interaction LUV	+	+/-	+
Amphipaticité	+	+/-	nd
Insertion lipidique	+	+/-	nd
Toxicité	-	-	-
Activité *in cellulo*	+	+	+

Notes : NP=nanoparticule. *Taille moyenne mesurée dans 5% glucose est exprimée en (diamètre.nm). La charge des NP mesurée dans 5% de glucose-5mM de NaCl est exprimée en mV. L'amphipathicité prend en compte la concentration et la pression auxquelles les CPPs saturent une interface eau/air. nd : non déterminé.

Greffage de polyéthylène glycol (PEG)

Les premiers éléments rencontrés par les nanoparticules lors d'une administration par voie systémique sont les composants du sérum. Nous avons donc analysé leur influence sur les nanoparticules de CADY/siRNA. Les résultats ont permis de conclure que le sérum n'induit pas de déstabilisation des solutions colloïdales. En effet, la légère augmentation des tailles moyennes (260 nm contre 106 nm en 5% de glucose) ne semble pas correspondre à un phénomène d'agrégation car dans ce cas les tailles moyennes obtenues sont largement supérieures au micron. Comme dans

le cas de nanoparticules lipidiques administrées par voie systémique (310), nous supposons que l'augmentation de la taille est due à l'adsorption de protéines sériques à leur surface. Cette « couronne protéique » est connue pour initier le phénomène d'opsonisation amenant à l'activation du système immunitaire non-spécifique et à l'élimination rapide des nanoparticules (242,311). La présence de la couronne protéique peut contribuer à modifier les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules (257). Etant chargées négativement (le composant principale, l'albumine, possède un pKa de 4,6 lui donnant une charge globale nette négative dans des conditions physiologiques), les protéines sériques ont une forte propension à interagir avec les particules cationiques leur conférant ainsi une charge globale négative (181,256). Il semblerait que cette couronne puisse éventuellement se former sur des particules chargées négativement : des particules modèles de polystyrène fonctionnalisées avec des groupements carboxylates permettent la formation d'une couronne protéique après une incubation en présence de sérum (256). A l'instar de notre équipe, d'autres auteurs ont pu valider l'influence des protéines sériques sur la taille de leurs particules peptidiques ainsi que sur leur charge qui devient négative en présence de sérum (312,313). Néanmoins, le Dr El Andaloussi et coll. garantissent une stabilité de leurs particules au moins une heure après la mise en présence avec le sérum tandis que les nanoparticules CADY/siRNA restent stables en solution près de deux jours post-formulation. Seulement, ce test *in vitro* ne reflète probablement pas les conditions *in vivo* chez la souris où la circulation sanguine de nanoparticules y est très rapide. Toutefois, afin de valider l'hypothèse de la couronne protéique, la technique de diffusion de lumière pourrait-être complétée par d'autres méthodes déjà éprouvées: la technique de poursuite/analyse de nanoparticules ou NTA (pour *nanoparticule tracking and analysis)*, la spectrométrie de masse, l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, la chromatographie d'exclusion stérique (257).

En prenant en compte l'effet du serum et suite aux résultats obtenus avec PCY4 *in vivo*, nous avons décidé de greffer une chaîne de polyéthylène glycol (poids moléculaire = 2000 g/mol) sur la séquence de CADY afin d'augmenter la stabilité des nanoparticules dans la circulation sanguine. Cet écran hydrophile doit limiter l'adsorption des protéines sériques sur les nanoparticules (257). Il est clairement admis que de courtes chaines de PEG (poids moléculaire < 1000 g/mol) seraient

moins efficace dans ce rôle d'écran que de longues chaines (314). Nous avons choisi un PEG avec un poids moléculaire de 2000 g/mol, car cette longueur de chaîne est la plus représentée dans la littérature concernant la PEGlyation de nanoparticules (315–321).

Le vecteur CADY PEGylé (CPEG) a donc été analysé en terme de formulation des nanoparticules en présence de siRNA (affinité pour le siRNA, taille moyennes, IPs, interaction avec des lipides) et d'efficacité de transfection *in cellulo* (Tableau 5.3). En termes d'affinité pour le siRNA, de stabilité et d'efficacité de transfection, aucune différence significative entre les complexes formés avec CADY et ceux formés avec CPEG n'est observée. Les différentes formulations testées indiquent des tailles de particules et des IPs sensiblement équivalents mais des potentiels zêta différents ($PZ_{CPEG} < PZ_{CADY}$), suggérant que le motif PEG se place préférentiellement à l'extérieur de la nanoparticule.

Dans le domaine des nanoparticules thérapeutiques, la PEGylation est particulièrement décrite pour des particules à base de polymères ou de lipides et semble améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques (322–325). En ce qui concerne les CPPs, peu d'exemples de peptides vecteurs directement conjugués à un motif PEG ont été publiés. Par exemple, l'équipe du Pr Leroux a développé une stratégie de délivrance à l'aide d'un CPP PEGylé (PEG-M918K), activable seulement dans la muqueuse intestinale à l'aide d'une réductase bactériale (326). Cette stratégie innovante a été approuvée par la réduction de l'expression de la luciférase suite à la transfection d'oligonucléotide (PNA) dans des cellules du carcinome du colon (HT-29-Luc+).

Notre équipe avait aussi précédemment montré que l'administration par voie intraveineuse de PEG-Pep3 complexé à un PNA ciblant la cycline B1 réduisait fortement la croissance tumorale sur un modèle de souris xénogreffé avec des cellules cancéreuses de prostate (PC3) (327). Tandis que Pep3 non-PEGylé a le même effet uniquement après une administration en intratumorale. Les résultats laissent supposer que l'efficacité de PEG-Pep3 est principalement due à une stabilité accrue des complexes vis-à-vis du sérum.

Au travers de ces quelques exemples et malgré le nombre limité d'applications *in vivo*, la PEGylation de CPP apparait comme une solution favorable pour améliorer la

circulation de nanoparticules formées à l'aide de vecteurs peptidiques. Toutefois, la PEGylation peut également avoir des effets délétères sur les propriétés d'internalisation cellulaire des CPPs. En effet, Ziegler et Seelig ont montré que le peptide vecteur WR9 avait un meilleur taux de transfection pour un plasmide codant pour la protéine GFP (*green fluorescence protein*) que son homologue PEGylé (209). En effet, la PEGylation du vecteur WR9 induit une internalisation par les voies d'endocytose et conduit à la rétention du plasmide dans les vésicules endosomales, tandis que WR9 internalise le plasmide via un mécanisme de translocation directe dans la cellule.

Dans notre cas, la PEGylation ne semble pas avoir d'effet délétère ni sur la formation des nanoparticules CPEG/siRNA ni sur leur efficacité de transfection. Néanmoins, il est primordial d'effectuer des analyses complémentaires afin de mieux comprendre l'effet de la PEGylation sur les propriétés de surface des nanoparticules car elles influencent la morphologie ou le devenir de nos nanoparticules. En effet, le degré de recouvrement, la conformation ou l'épaisseur de la couche de PEG sont des paramètres interconnectés dont il faut tenir compte dans l'analyse des propriétés de surfaces des nanoparticules CPEG/siRNA. Le degré de recouvrement détermine la conformation des PEGs, étendus ou repliées, jouant ainsi sur l'accessibilité aux protéines sériques (325). Il est généralement admis que plus il y a de PEG en surface d'une particule, plus ils adoptent une conformation étendue maximisant le refoulement des protéines sériques (247,325). De plus, il a été montré *in vivo* que lorsque l'on augmente le pourcentage de PEG dans l'enveloppe lipidique de nanoparticules polymériques, le taux de nanoparticules détectées dans le sang augmente tandis que l'accumulation dans le foie diminue après une administration par voie intraveineuse (269).

L'utilisation massive de PEG sur toutes sortes de molécules (protéines, acides nucléiques, nanoparticules) pour en améliorer la circulation dans un organisme s'est justifiée par leur caractère hydrophile élevé, leur biocompatibilité et leur biodégradabilité. Cependant quelques études ont mis en évidence la production d'anticorps anti-PEG après une administration répétée de particules fonctionnalisées par du PEG (328–331). Le paragraphe suivant décrit donc plusieurs alternatives au PEG qui peuvent être envisagées pour la conception et l'administration de futures nanoparticules.

5. Perspectives quant à l'utilisation des nanoparticules CADY/siRNA

En prenant en compte la totalité des résultats présentés au cours de cette thèse, nous pouvons clairement mettre en avant que CADY est le vecteur le plus performant que nous avons développé pour le transfert de siRNA en vue d'une application *in vivo*. Toutefois, sur la base de ces travaux, les perspectives futures sur le développement d'autres peptides vecteurs seront axés sur quatre points majeurs : I) la formulation, II) le ciblage spécifique, III) la circulation dans les fluides biologiques et IV) la fonctionnalisation multiple.

La formulation des nanoparticules :

A ce jour, les valeurs de la taille moyenne et de l'IP des nanoparticules CADY/siRNA (106 nm ; 0,357) représentent une moyenne de l'ensemble des mesures effectuées pendant l'étude dans les conditions de stabilité les plus favorables. Si une certaine variabilité de ces valeurs peut cependant être observée en fonction de l'expérimentateur, celles-ci restent néanmoins toujours dans le même ordre de grandeur. Afin de pouvoir exclure cette variabilité nous prévoyons donc d'effectuer différentes formulations de CADY/siRNA à l'aide d'un pipetage automatique standardisé (ex. Tecan, accessible au CRBM). Tous les échantillons ainsi formulés seront ensuite analysés et comparés par la méthode de la diffusion de lumière (DLS). Cette approche devrait permettre de réduire la variabilité potentielle liée au pipetage (expérimentateur et pipette).

Séquence de ciblage pour une vectorisation plus spécifique :

Suite aux résultats peu prometteurs obtenus avec PCY4, nous envisageons de tester d'autres séquences de ciblage afin de pouvoir vectoriser les nanoparticules à travers la BHE. Par exemple, la transferrine est régulièrement décrite comme un ligand de ciblage dont les récepteurs sont abondants sur les cellules endothéliales du cerveau mais aussi sur les cellules de glioblastomes (332,333). Cependant, nous planifions d'utiliser des séquences de ciblage plus courtes que la transferrine afin de perturber au minimum les propriétés intrinsèques de CADY et la formation des nanoparticules CADY/siRNA. Dans ce contexte, nous prévoyons d'utiliser le peptide de 12 résidus GL1, LLADTTHHRPWT, préalablement isolé par la technique de phage display après une mise en présence des phages avec des cellules de gliomes issues de biopsies humaines (334)). Nous envisageons aussi d'exploiter les peptides de la famille des RGD, tripeptide ciblant spécifiquement les intégrines alpha (v) bêta (3) souvent surexprimés sur certains cancers, et notamment les gliomes (335–337). Récemment, le Dr Vivès a conçu un nouveau peptide RGD tetracyclique ayant une meilleure affinité pour les cellules tumorales, que le peptide RGD pentacyclique, habituellement utilisé dans la plupart des études de ciblage (338). Le greffage de cette entité RGD tetracyclique sur nos nouveaux vecteurs fait partie d'un projet en collaboration avec le Dr Aldrian (SYSDIAG-UMR3145, Montpellier) et le Dr Couillaud (Université de Bordeaux, Neurocampus).

La stabilisation des nanoparticules au cours de la circulation sanguine :

Les premiers résultats obtenus avec CPEG sont encourageants. Cependant, dans le cadre du développement de nanoparticules dont les demi-vies sont prolongées dans la circulation sanguine, ce point reste une étape importante qui devrait bientôt être vérifié par des essais de biodistribution *in vivo*.

La capacité de transfection et la stabilité d'un vecteurs cationiques peuvent être également améliorées en adsorbant à leur surface une couche de polysaccharides anioniques de types glycoaminoglycanes (GAGs) (339–341). L'un des plus fréquemment utilisés est l'acide hyaluronique, il protège des nanoparticules

micellaires à base de polymères conservent leur tailles en présence de protéines sériques (342,343). De plus, l'acide hyaluronique régule l'angiogenèse dans différentes tumeurs qui présentent abondamment certains de ces récepteurs tels que CD44 et RHAMM. Cet aspect fait de l'acide hyaluronique une alternative pour améliorer à la fois la biodistribution et le ciblage de certains cancers (344,345).

Développement de nanoparticules multivalentes :

Une nanoparticule multivalente est décrite comme un système qui encapsule une molécule thérapeutique et peut être de nature polymérique, lipidique, métallique ou peptidique. La surface de la nanoparticule est fonctionnalisée de manière à franchir les différentes barrières biologiques pour des applications *in vivo*. Par exemple, l'entité de ciblage sert à amener la particule vers un type cellulaire particulier, le vecteur améliore le transfert à travers la membrane plasmique et un agent de contraste apporte une dimension d'imagerie, de suivi et donc de diagnostic à la particule (Figure 5.1). De plus, les nanoparticules peuvent être greffées avec une entité PEG qui permet d'améliorer la demi-vie dans la circulation sanguine ou avec une entité sensible à un environnement particulier (pH, redox, enzyme, température, etc.) (Figure 5.1). Ce système multifonctionnel a déjà été largement étudié pour les nanoparticules de lipoplexes ou de liposomes qui donnent des résultats prometteurs pour la délivrance de molécules thérapeutiques (346,347).

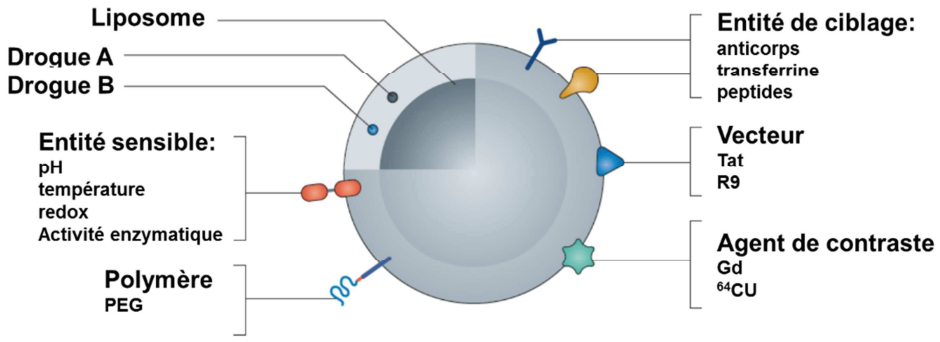


Figure 5.1 : Schéma de nanoparticules liposomales multivalentes. Figure adaptée de (346).

Dans cette optique, nous souhaiterions développer, à partir du vecteur CADY, des nanoparticules peptidiques multivalentes. En effet notre étude a permis de caractériser les propriétés colloïdales et de tester plusieurs possibilités de fonctionnalisation des nanoparticules CADY/siRNA. Ces différents aspects permettent donc d'entrevoir la conception de nanoparticules multifonctionnelles de 3ème génération.

Dans ce contexte, nous envisageons de fonctionnaliser CADY avec une séquence de ciblage peptidique (CIB) et un PEG. Certains groupes ont montré que le greffage d'une chaîne grasse de type stéaryle permettait d'augmenter l'hydrophobicité et d'améliorer l'interaction des nanoparticules avec les lipides (137,348,349). Cette modification est également envisagée pour nos nanoparticules. Dans ce cas il faudra vérifier que la position des entités greffées, en N-terminale ou C-terminale, ainsi que la position du ciblage (en surface de la particule ou directement sur le PEG) ne sont pas délétères à la formation, la stabilité et l'activité des nanoparticules de 3ème génération. De même, il sera également primordial de veiller à déterminer les proportions et la stœchiométrie optimale de chaque entité apportant une fonctionnalité à la particule.

Les nanoparticules à base de peptides amphipathiques présentent l'avantage principal de permettre un transfert direct du siRNA dans le cytoplasme tandis que les lipoplexes ou polyplexes sont connus pour passer essentiellement par les voies d'endocytoses. Les vecteurs peptidiques constituent également une alternative aux virus recombinants. En effet, en contrôlant précisément leur formulation et en les adaptant au fur et à mesure aux contraintes extra et intracellulaires, il est possible de s'affranchir de la complexité, de la difficile reproductibilité, et du coût important des préparations virales obtenues à partir de cellules en culture. Les vecteurs peptidiques sont aussi beaucoup plus attractifs en raison de risques infectieux et immunogènes moindres, ce qui est particulièrement important lorsque des administrations répétées de l'agent thérapeutique sont nécessaires.

A ce jour les méthodes de délivrance sont aussi variées que les molécules thérapeutiques à internaliser. L'utilité des systèmes de vectorisation n'est plus à démontrer et on peut d'ailleurs noter leur implication dans de nombreux essais

cliniques autant dans le traitement de maladies chroniques que de maladies génétiques.

Parmi les avancées récentes dans le domaine des nanotechnologies, l'utilisation de nanoparticules pour la vectorisation de molécules à visée thérapeutique est une approche à part entière. Leurs conceptions, leurs mises en œuvre et leurs applications en vue d'un développement clinique nécessitent une approche multidisciplinaire alliant la physique, la chimie, la biologie et la médecine. Les nanoparticules multifonctionnelles s'intègrent dans la vision révolutionnaire de la « *magic bullet* » du prix Nobel Paul Elhrich développée il y a plus d'un siècle. Il rêvait déjà d'une molécule thérapeutique avec une forte spécificité pour le tissu cible, d'une grande efficacité et sans induction de toxicité et d'effets secondaires. Actuellement, les connaissances sur les pathologies (très souvent multifactorielles) et les moyens de diagnostic plus performants mènent vers une médecine de plus en plus personnalisée. Il serait alors intéressant qu'à partir d'une nanoparticule renfermant une ou plusieurs substances actives de pouvoir lui adapter différentes fonctions correspondants directement aux caractéristiques de la maladie détectée chez un patient. Dans ce contexte, les prochaines années verront le développement des nanoparticules fonctionnelles tourné vers une application dite « théranostique ». Le mot théranostique provient de la contraction des mots thérapeutique et diagnostique, ce qui signifie que les nanoparticules futures seront utilisées pour l'application de molécules thérapeutiques et d'imagerie. De même que le diagnostic et l'efficacité thérapeutique, la prolongation de l'effet thérapeutique a aussi son importance. Les nanoparticules fonctionnalisés peuvent être intégrer à un système de gel biodégradable (sous forme d'implant par exemple) favorisant la libération prolongée et ciblée de la molécule thérapeutique. En définitive, la multitude de fonctionnalisations possibles (molécules magnétiques, anticorps, peptides, lipides et polymères sensibles ou non à l'environnement etc.) des nanoparticules et leur assimilation dans des systèmes plus complexes constituent un énorme potentiel quant à leur application dans le domaine biomédicale.

CHAPITRE 6 – Protocoles expérimentaux

1. Matériel

1.1. Peptides

Le peptide CADY a été synthétisé par la société Polypeptide (France), les peptides PSF1, PSF2, PSF3, PG9, PG16, PSW, PCY4 par la société GLS (Chine), CADY-[Cya], CADY-K et CPEG par la plateforme de synthèse peptidique du CRBM (Gudrun Aldrian, CRBM, Montpellier). Leurs séquences sont regroupées dans le Tableau 2.1. Les séquences de tous les peptides ont été contrôlées par HPLC et spectroscopie de masse, montrant une pureté ≥ 95%.

Afin d'analyser le caractère hydrophobe des séquences peptidiques, le « *Grand Average of Hydropathy* » ou GRAVY (350), a été calculé à partir du logiciel « Protparam » (http://web.expasy.org/protparam/). La valeur GRAVY est calculée en additionnant les valeurs d'hydropathie de chaque résidu et en divisant cette somme par la longueur de la séquence. L'hydrophobicité théorique d'un peptide est ainsi directement proportionnelle à la valeur du GRAVY. Les valeurs GRAVY sont répertoriées dans le Tableau 3.2 (cf. CHAPITRE 3, § 3.1).

Tous les peptides utilisés sont pesés sur une balance de précision (Mettler Toledo, modèle AG245) puis repris dans de l'eau ultra pure. Cette solution est homogénéisée, placée dans un bain à ultrasons, puis centrifugée à 13 400 rpm, chaque étape durant 10 minutes. Le surnageant est repris dans un nouveau tube et filtré à l'aide de filtres millex GV (Millipore, 0,22 µm). Toutes ces étapes permettent d'obtenir une solution de peptide contenant uniquement la fraction soluble. Ensuite, la présence de résidus tryptophanes et/ou tyrosines permet la mesure de la concentration de la solution par spectroscopie d'absorbance à 280 nm (NanoDrop). Cette technique emploie la relation de Beer-Lambert pour relier l'absorbance à la concentration :

$$A = \varepsilon \, l \, C \qquad \textbf{Equation 1}$$

- A : absorbance
- ε : coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$
- l : largeur de cuve en cm
- C : concentration de la solution en mol/L

Pour chaque peptide le coefficient d'absorption molaire est déterminé en fonction du nombre de tryptophanes et/ou de tyrosines inclus dans la séquence primaire, sachant qu'un tryptophane équivaut à un coefficient de 5 500 $l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ et une tyrosine à un coefficient de 1 490 $l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$. Les solutions mères (concentrations entre 300 et 900 µM) sont aliquotées puis stockées à 4°C.

Tableau 6.1 : Liste des peptides vecteurs de l'étude

Nom	Séquence	Pm (g/mol)	pI
CADY	GLWRALWRLLRSLWRLLWKA –Cya	2653	12,5
CADY-[Cya]	GLWRALWRLLRSLWRLLWKA	2594	12,5
PSF1	GLFRALWRLLRSLWRLLWKA	2555	12,5
PSF2	GLWRALFRLLRSLWRLLWKA	2555	12,5
PSF3	GLWRALWRLLRSLFRLLWKA	2555	12,5
PG9	GLWRALWRALWRSLWRLKRKV	2751	12,6
PG16	GLWRALWRGLRSLWRLLWKV	2566	12,5
PSW	GLWRALWRLWRSLWRLLWKA	2667	12,5
PCY4	YIGSRS-GLWRALWRLLRSLWRLLWKA	3258	12,2
CADY-K	GLWRALWRLLRSLWRLLWK	2523	12,5
CPEG	GLWRALWRLLRSLWRLLWK-Cya-PEG	4582	12,5

Notes : Pm (poids moléculaire), pI (point isoélectrique) obtenus par un logiciel de calcul des caractéristiques physico-chimiques des protéines, « Protparam » (http://web.expasy.org/protparam/).Tous les peptides possèdent un C-terminus amidé (-ONH_2) excepté CADY et CPEG (Pm_{PEG} = 2000 g/mol) qui possèdent une fonction cystéamide (-ONH-CH_2-CH_2-SH).

1.2. Les petits ARN interférants : siRNA

Les petits ARN interférents sont de petits ARN pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messager et ainsi empêcher l'expression d'un gène en clivant cet ARN. Cet effet est généralement nommé « *knock-down* ». Dans ce projet de thèse, trois siRNAs différents ont été utilisés : siRNA-Cycline B1, siRNA-GAPDH et siRNA-Luciférase (ou siRNA-Luc) fournis par Eurogentec (France).

Le siRNA-Cyclin B1 (21 mers) est un oligonucléotide qui cible l'ARNm de la cycline B1. La cycline B1 forme avec la protéine CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*) un complexe cdk/cycline indispensable aux cellules eucaryotes pour entrer en mitose. Dans tout type de cancer, la croissance cellulaire est déréglée (multiplication excessive des cellules cancéreuses). Cette croissance désordonnée étant souvent associée à une dérégulation des complexes CDK/cyclines, la cycline B1 apparait ainsi comme une cible thérapeutique potentielle (351).

Le siRNA-GAPDH (21 mers) est un oligonucléotide qui cible l'ARNm de la Glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase. C'est une enzyme qui intervient principalement dans le processus de dégradation du glucose afin de produire de l'énergie. Dans le but de valider et d'optimiser l'efficacité d'agents de délivrance ainsi que les conditions de transfection, il est important d'inclure un contrôle positif dans le set d'expérience. Dans ce cadre, la GAPDH est une cible intéressante car c'est une protéine ubiquitaire hautement exprimée dans les cellules humaines, de souris et de rats. L'introduction d'un siRNA-GAPDH dans une cellule entraîne alors un « *knock-down* » de l'expression de la protéine relatif à la capacité de transfection de l'agent de délivrance étudié. L'évaluation du « *knock-down* » va aussi servir à déterminer la formulation optimale pour l'activité biologique.

Le siRNA-Luc (21 mers) est un outil largement utilisé en biologie moléculaire pour analyser *in cellulo* le transfert de siRNA sur des cellules transgéniques exprimant la luciférase comme gène rapporteur. Les luciférases sont des enzymes contrôlant l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine provoquant l'émission d'un photon. La luciférase la plus connue est celle de *Photinuspyralis*, dont la réaction nécessite la présence d'ATP, hydrolysé en AMP, et d'ions magnésium. Cette réaction s'accompagne d'une émission de photons proportionnelle à la quantité de protéines

présente (Figure 6.1). Cette émission de photons peut être quantifiée grâce à un luminomètre à plaque (Polarstar, BMG Labtech). L'efficacité de transfection est calculée en faisant le rapport entre l'activité luciférase obtenue pour les cellules traitées et celle obtenue pour les cellules contrôles.

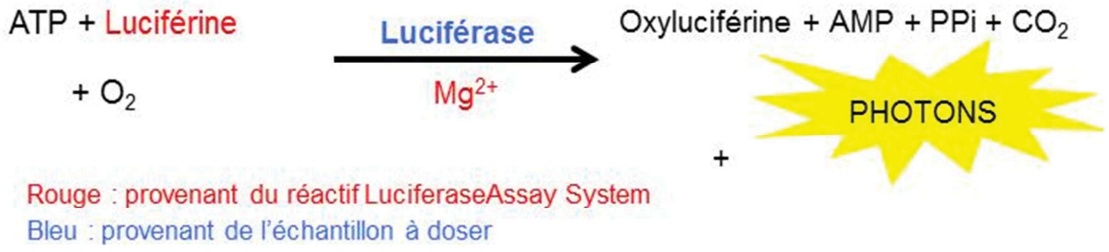


Figure 6.1: Réaction chimique intervenant dans le dosage de la luciférase

Tous les siRNAs obtenus sous forme lyophilisée sont resuspendus dans l'eau ultra pure afin d'obtenir des solutions mères (20-100 µM), qui sont ensuite aliquotées et stockées à -20°C. Leurs séquences sont présentées dans le Tableau 2.2 :

Tableau 2.2 : Liste des siRNA utilisés pour l'étude.

Nom	Séquences
Cycline B1-s	5'-GAA-AUG-UAC-CCU-CCA-GAA-AdTdT-3'
Cycline B1-as	3'-dTdTU-UUC-UGG-AGG-GUA-CAU-UUC-5'
GAPDH-s	5'-CAU-CAU-CCC-UGC-CUC-UAC-UdTdT-3'
GAPDH-as	3'-dTdTG-UAG-UAG-GGA-CGG-AGA-UGA-5'
Luc-s	5'-CU-ACG-CUG-AGU-ACU-UCG-AdTdT-3'
Luc-as	3'-dTdT-GAA-UGC-GAC-UCA-UGA-AGC-U-5'

Notes : s = brin sens, as = brin anti-sens.

1.3. Lipides et préparation des LUVs

L'ensemble des lipides utilisés sont fournis par AVANTI polar lipids (USA) : 2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphatidyl-glycerol (DOPG), N-octadecanoyl-D-*erythro*-sphingosylphosphoryl-choline (communément appelé sphingomyéline, (SM)) et cholestérol (chol). Les solutions mères de lipides sont conservées à -20°C, dans un flacon en verre, à une concentration de 25 mg/ml dans un mélange de chloroforme/méthanol (3/1, v/v). Après la dissolution du lipide, on remplace l'air par l'argon dans le flacon pour éviter les phénomènes d'oxydation.

Les larges vésicules unilamellaires ou LUVs sont préparées à partir d'un mélange de lipides DOPC/SM/chol dans les proportions suivantes 40/40/20 en ratio molaire. Sur la base d'1 mg de DOPC, les volumes correspondants sont 40 µl, 38 µl et 10 µl pour DOPC, SM et Chol respectivement à partir des solutions mères à 25 mg/ml. Les solvants sont ensuite évaporés sous vide avec un évaporateur rotatif (environ 1 h à 70°C). Puis les lipides sont resuspendus dans l'eau par agitation au vortex conduisant à la formation de liposomes multilamellaires. La solution lipidique subit 5 cycles de congélation-décongélation avant d'être homogénéisée par extrusion à l'aide d'un mini extrudeur AVANTI Polar Lipids sur une membrane en polycarbonate (taille des pores : 100 nm, Whatman). Cette étape permet d'obtenir des liposomes unilamellaires et de centrer leur taille autour de 100 nm. La préparation de LUVs est conservée une nuit à 4°C avant utilisation.

2. Modélisation des peptides vecteurs

2.1. « *Helical Wheel Projections* »

La structure tridimensionnelle des hélices alpha peut être représentée par des projections bidimensionnelles appelées *Helical Wheel* (352). Elle permet une visualisation directe de l'arrangement des résidus autour de l'axe de l'hélice. Cette projection donne donc une idée du caractère amphipatique d'un peptide dans sa conformation hélicoïdale, c'est-à-dire que les chaînes latérales hydrophobes et

hydrophiles sont clustérisées dans des zones distinctes de l'hélice. La séquence d'acides aminés tourne vers la droite autour de l'axe de l'hélice avec un angle de rotation entre acides aminés consécutifs de 100 degrés, de sorte que la représentation finale commence du côté N-terminal du peptide.
Nous avons utilisé la version *wheel.pl,v 1.4 2009-10-20* du logiciel « *Helical Wheel Projections* » développé par Don Armstrong and Raphael Zidovetzki (353) pour observer le caractère amphipathique de nos peptides vecteurs (voir http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi?sequence=ABCDEFGHIJLKMNOP&submit=Submit).

2.2. « *I-Tasser* »

« *I-Tasser* » est un logiciel de modélisation moléculaire développé par le laboratoire de Yang Zhang pour prédire la structure tridimensionnelle des protéines et des peptides à partir de leur séquence primaire (354,355). Le logiciel détecte des structures similaires dans la « *Protein Data Bank* » (PDB) par une technique dite de reconnaissance des repliements : il s'agit de modéliser des séquences ayant un repliement similaire à une protéine connue de la PDB. La protéine complète est construite en réassemblant les différents fragments issus des structures modèles précédemment identifiées en utilisant la méthode dite « simulation de Monte Carlo ». Les modèles énergétiquement stabilisés sont ensuite identifiés et leurs structures finales sont affinées à l'aide de différents algorithmes complémentaires. Enfin « *I-Tasser* » est également un logiciel qui permet de prédire la fonction des protéines par rapport à leur structure (356).

La version v4.2 de « *I-Tasser* » a été utilisée pour déterminer les structures énergétiquement stabilisées de nos différents CPPs (voir http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). « *I-Tasser* » peut fournir pour chaque CPP plusieurs modèles. Nous avons choisi de comparer les modèles en fonction de leur C-score, paramètre mesurant la fiabilité du modèle. La valeur C-score est typiquement comprise dans une gamme entre -5 et 2, plus elle est élevée et plus le modèle est fiable. Donc nous avons choisi pour chaque CPP le modèle avec le C-score le plus élevé puis nous avons ainsi comparé les CPPs.

3. Formulation des complexes CPP/siRNA

La stratégie non covalente est privilégiée dans nos études. Elle consiste à mettre le peptide vecteur en présence de siRNAs dans le solvant souhaité (eau, HEPES, NaCl, PBS, excipients, etc.) pour former un complexe stabilisé par des interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement du peptide et les groupements phosphates du siRNA (chargés négativement). Les complexes sont formulés à différents ratios molaires (R), généralement avec un excès de peptides. Le mélange est ensuite homogénéisé au vortex pendant 2-3 sec puis incubé 30 min à température ambiante (TA) pour les expériences *in vitro,* où à 37°C pour les expériences *in cellulo* (Figure 6.2).

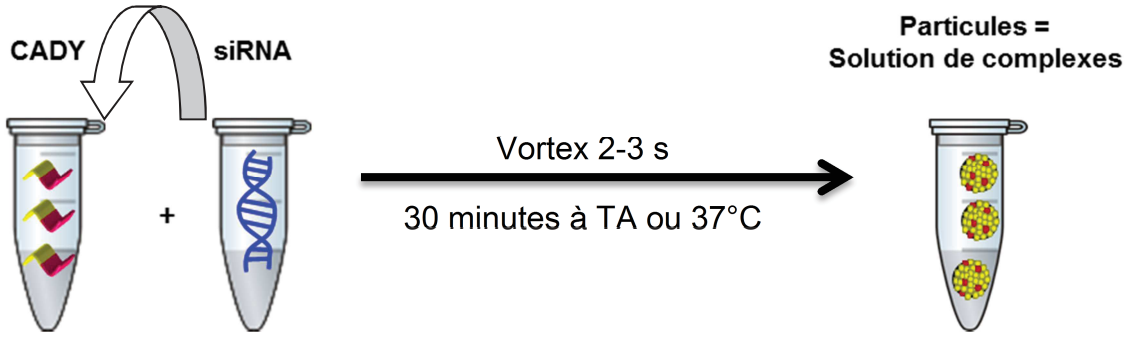


Figure 6.2 : Principe de la formulation des complexes CPPs/siRNA.

Selon les besoins, les particules peuvent subir une ou plusieurs étapes additionnelles :

- Extrusion avec un mini extrudeur AVANTI polar lipids équipé d'une membrane en polycarbonate (100 µm, Whatman).
- Lyophilisation (Appareil Virtis) toute la nuit et les lyophilisats obtenus sont re-suspensdus dans de l'eau milliQ.

Les différentes conditions de formulation sont caractérisées en mesurant la taille des particules et/ou leur charge de surface avec le NanoZS (Malvern) (cf. CHAPITRE 4).

3.1. Mesure de l'affinité CPP/siRNA par spectroscopie de fluorescence

Une molécule, sous l'effet d'une irradiation lumineuse ($h\upsilon_A$), passe d'un état fondamental à un état excité. Le retour à l'état initial nécessite une restitution de cette énergie et généralement il s'opère en passant par des états intermédiaires. Lorsque le retour passe par un état triplet (T_1), avec des électrons de spins non appariés, on obtient l'émission d'un photon de phosphorescence ($h\upsilon_P$). Lorsque ce retour passe par un état singulet (S_1), avec des électrons de spins appariés, on a l'émission d'un photon de fluorescence ($h\upsilon_F$) (Figure 6.3).

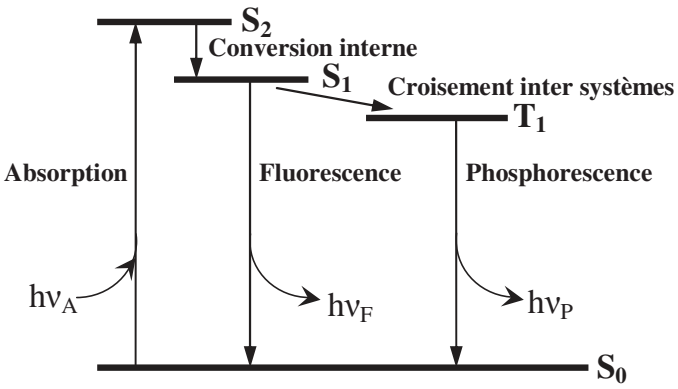


Figure 6.3 : Diagramme de Jablonski. Transitions permettant le retour de l'état excité à l'état initial S0 (S_1 : état singulet, T_1 : état triplet).

Cette fluorescence peut être modifiée selon l'environnement dans lequel se trouve le fluorophore. Les interactions peptides/siRNA peuvent être étudiées grâce à la présence de groupements fluorescents intrinsèques greffés par synthèse chimique sur l'un des partenaires, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dans notre cas. L'étude de la fluorescence du siRNA conjugué avec la FITC permet de déterminer les constantes d'affinité des CPPs pour l'oligonucléotide. Pour cela on réalise une expérience de titration qui consiste à suivre l'évolution de l'intensité de fluorescence siRNA-FITC en présence de quantités croissantes de peptides.

Conditions expérimentales :

Les mesures de fluorescence sont réalisées avec un fluorimètre à lecteur de plaque 96 puits (Polarstar, BMG). Au départ, chaque puits contient une concentration fixe de siRNA-GAPDH-FITC à 200 nM dans 200 µl de PBS à 0,5X. On réalise une expérience de titration en ajoutant dans chaque puits des quantités croissantes de peptide allant jusqu'un ratio molaire de 50 peptides pour un siRNA (R=50), tout en laissant un puits témoin ne contenant pas de peptide. La sonde FITC fluorescente portée par le siRNA est excitée à 492 nm et l'émission est enregistrée à 520 nm.

Si le CPP interagit avec le siRNA-FITC, on observe un quenching dose-dépendant de la sonde FITC. Les raisons de la diminution de l'intensité de fluorescence sont multiples et souvent mal définies. Parmi elles on peut citer les transferts d'énergie dus aux interactions directes entre les aromatiques du peptide et les aromatiques de la sonde ou le changement d'environnement de la sonde lié à la formation du complexe avec le siRNA.

La variation de l'intensité de fluorescence est enregistrée en fonction de la concentration en peptide. Les données sont analysées à l'aide du logiciel GraFit (Erathicus, version 32), qui permet de tracer la courbe de régression à partir d'une équation quadratique et d'obtenir la constante de dissociation du complexe :

$$F = Fmax - (Fmax - Fmin) * \{b - [b^2 - 4 * l * (p*n)]^{1/2}\} / (2 * (p*n)) \quad \textbf{Equation 2}$$

$$b = Kd + l + (p*n) \quad \textbf{Equation 3}$$

- **F** correspond à l'intensité de fluorescence observée.
- **Fmax** est l'intensité maximale de fluorescence à t = 0.
- **Fmin** est l'intensité de fluorescence lorsque le signal est saturé.
- **p** est la concentration en siRNA-FITC (200 nM).
- **l** est la concentration en peptide vecteur.
- **Kd** est la constante de dissociation du complexe peptide/siRNA-FITC.
- **n** est le ratio molaire peptides/siRNA-FITC.

3.2. Evaluation du niveau de complexation des CPP/siRNA par électrophorèse de décalage (Gel Shift Assay)

Afin de vérifier « l'encapsulation » des siRNAs à différents ratios molaires, la méthode d'électrophorèse de décalage sur gel d'agarose a été mise en œuvre. Un volume de 30 µl d'un mélange CPP/siRNA, correspondant à 100 pmol en acides nucléiques, a été formulé dans une solution aqueuse contenant 5% de glucose (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose (Invitrogen) de 1% (w/v) dilué dans un tampon TBE (pour *Tris, Borate, EDTA*) contenant un intercalant d'acide nucléique, le GelRed (Interchim), puis un champ électrique de 50 V est appliqué pendant 30 min. Finalement, le gel d'agarose est placé sous lumière UV (E-box, Vilber) pour révéler le siRNA non complexé grâce à l'intercalation du GelRed. Dans le but de vérifier la stabilité des complexes, la même expérience est effectuée en présence de 5 µg d'une molécule chargée négativement et compétitrice du siRNA, en l'occurrence l'héparane sulfate (Sigma-Aldrich).

L'intensité des bandes observées, correspondant à l'ARN non complexé au CPP, est mesurée à l'aide du logiciel Image J 1.48 (voir http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html) puis normalisées à l'intensité du siRNA seul.

4. Mesure des propriétés colloïdales par la diffusion dynamique de la lumière

Les complexes formés par l'autoassemblage du siRNA avec les peptides vecteurs sont assimilés à un système colloïdal. Un colloïde est une suspension d'une ou plusieurs substances, dispersées régulièrement dans une autre substance, formant un système à deux phases séparées. Traditionnellement les solutions colloïdales sont définies à partir de plusieurs lois décrivant un comportement spécifique de la matière pour une échelle caractéristique de la taille de ses composants allant du nanomètre au micromètre. Elles sont donc intermédiaires entre les suspensions (particules de taille supérieure au micromètre) et les solutions dites « vraies » (particules de taille inférieure au nanomètre).

La caractérisation d'un tel système nécessite la connaissance des paramètres suivants : la taille, la charge de surface et la stabilité des particules dispersées. La technique de diffusion dynamique de lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering*) est la plus utilisée pour déterminer les caractéristiques d'une solution colloïdale. La DLS est une technique d'analyse spectroscopique non destructive qui utilise la propriété de la matière de disperser la lumière dans toutes les directions. La diffusion est dite de *Rayleigh* lorsque la longueur d'onde incidente est supérieure à la taille des particules diffusantes. Selon la théorie de Rayleigh, pour une source de lumière donnée, les grosses particules diffusent plus de lumière que les petites et l'intensité diffusée est proportionnelle au rayon hydrodynamique de la particule. Ce rayon est défini grâce au modèle de *Gouy-Chapman-Stern*, qui décrit qu'une particule chargée en solution interagit avec les ions de charge opposée du solvant pour former deux couches successives (Figure 6.4). La première couche dite de Stern est constituée d'ions très fortement liés à la particule, la seconde couche dite « diffuse » comporte des ions de signe opposé moins liés à la particule, et organisés en une sorte de nuage. Le rayon hydrodynamique (Rh) d'une particule correspond donc au rayon de la particule complété de l'épaisseur de la double couche ionique (Figure 6.4).

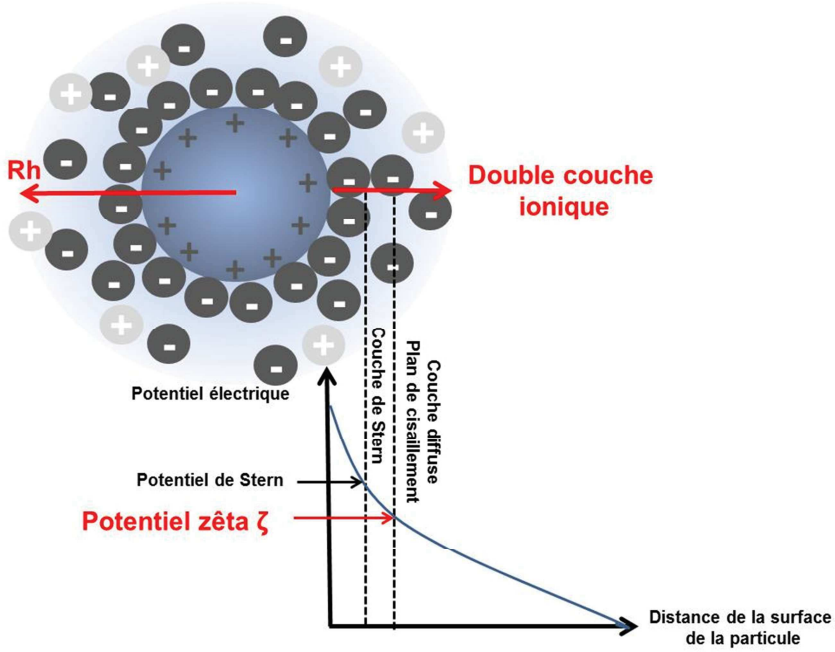


Figure 6.4: Schéma d'une particule en solution et de sa double couche ionique. Représentation du rayon hydrodynamique Rh et du potentiel zêta ζ.

Toute particule chargée en solution possède un potentiel de surface, ce dernier diminuant en fonction de la distance à la surface de la particule. Au niveau de la couche de Stern, le potentiel électrique correspond à un potentiel de surface modifié appelé potentiel de Stern. Les contre-ions de la couche de Stern étant indissociable de la particule, ce potentiel électrique est représentatif du potentiel de surface. Cependant le potentiel de surface et le potentiel de Stern sont des valeurs qui sont difficilement accessible par l'expérience. La charge de surface qui est communément mesurée est le potentiel zêta ζ, qui est le potentiel au plan de cisaillement. Quand une particule chargée est en mouvement, seule une partie du liquide contenant les contre-ions de la couche diffuse s'accroche à elle, l'autre partie étant plus mobile. Le plan qui sépare ces deux types de comportements du liquide correspond au plan de cisaillement (Figure 6.4). La distance de la surface de la particule à laquelle est estimée le potentiel zêta indique une valeur diminuée qui reste malgré tout représentative du potentiel de surface.

4.1. Mesure de la taille des particules des CPP/siRNA

Les tailles des particules CPP/siRNA ont été mesurées avec le NanoZS de Malvern Instruments SARL (France). Les applications habituelles de la diffusion dynamique de lumière sont la caractérisation des particules qui sont dispersées où dissoutes dans un liquide.

Lorsque l'on envoie une onde incidente sur une solution colloïdale, les particules en solution vont diffuser la lumière. Les fluctuations d'intensité de lumière enregistrées sont directement dépendantes du mouvement brownien des particules. Elles sont directement reliées au coefficient de Diffusion *D* et donc au rayon hydrodynamique des particules par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = (k_B\, T) / (6\, \pi\, \eta\, r) \qquad \textbf{Equation 4}$$

- D est le coefficient de diffusion des particules en m^2/s,
- k_B la constante de Boltzman en J/K, [ou $kg \cdot m^2/s^2$ K],
- T la température en K,

- η la viscosité du milieu dispersant en Pa/s [ou (kg/(m·s^2))/s],
- r le rayon hydrodynamique en m.

Concrètement, pour obtenir les coefficients de diffusion D des particules, l'appareillage du Nano ZS utilise un corrélateur qui calcule la perte de corrélation de la position d'une particule en fonction du temps en enregistrant les fluctuations de lumière. Pour les grosses particules avec un mouvement brownien faible, le signal change lentement et la corrélation persiste. A l'inverse, pour les petites particules qui bougent vite, le signal change rapidement et la corrélation est réduite entre deux positions d'une même particule (Figure 6.5). Une modélisation graphique permet d'extraire un temps caractéristique de décroissance de la corrélation et ce paramètre est relié au coefficient de diffusion. On obtient donc une fonction d'autocorrélation qui permet de relier la fluctuation de l'intensité de lumière avec la taille des particules (Figure 6.5).

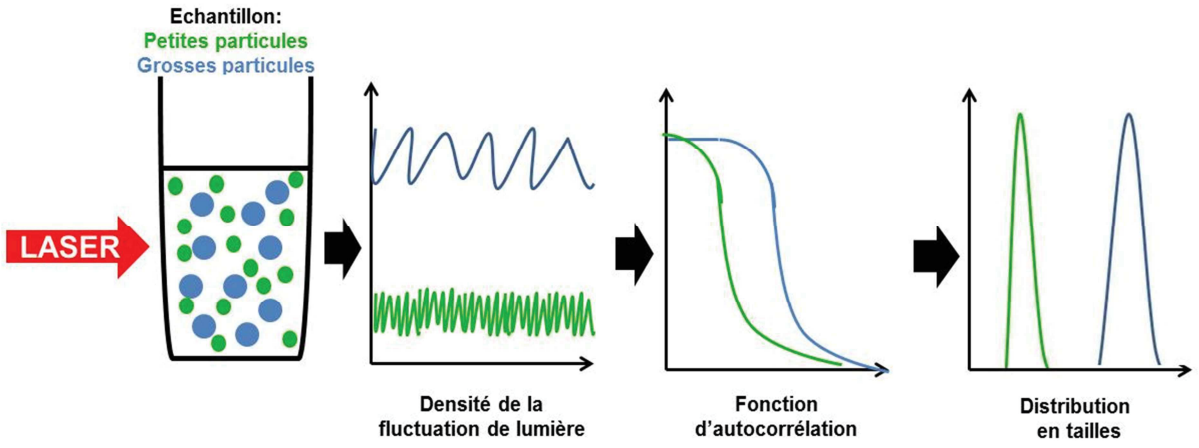


Figure 6.5 : Traitement du signal de diffusion de lumière en fonction de la taille des particules.

Les spectres représentants la distribution en tailles moyennes ainsi que des paramètres tels que la taille moyenne et l'indice de polydispersité des particules sont calculé à l'aide d'algorithmes (la méthode la plus commune est celle des cumulants) à partir de la fonction d'autocorrélation (Figure 6.5).

Conditions expérimentales :

La mesure des tailles de particules se fait dans des cuvettes à usage unique (Brand) avec un volume minimal de 400 µl à 25°C. La concentration en peptide formulé dans les particules varie entre 10 µM et 80 µM. Une mesure sur un échantillon donné correspond à 3 lectures (*run*) successives.

Pendant la mesure, l'analyse de la fonction d'autocorrélation donne des informations directes sur la validité de la mesure et la qualité de la distribution des particules en solution. En effet des coefficients de corrélation (rapport signal/bruit) inférieurs à 0,2 indiquent souvent que le signal est confondu avec le bruit de fond et donc que l'appareil ne détecte pas significativement de particules. Lorsque cette valeur est supérieure ou égale à 0,8 la mesure est considérée comme correcte et l'appareil détecte la présence significative de particules.

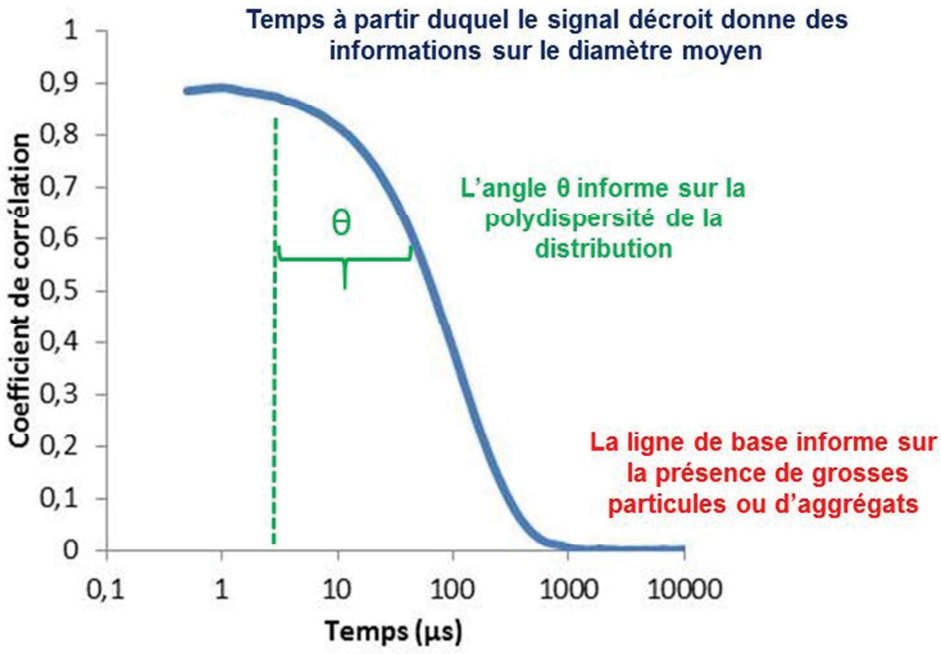


Figure 6.6 : Profil et interprétation d'une fonction d'autocorrélation. Plus le temps à partir duquel décroit le signal est faible, plus les particules observées sont de petites tailles. Plus l'angle θ est petit, plus les solutions sont monodisperses et plus l'indice de polydispersité est faible. Une ligne de base lisse (proche de 0) indique l'absence d'agrégats.

4.2. Mesure de la charge de surface des complexes CPP/siRNA

La mesure du potentiel zêta ζ (PZ) ou charge de surface d'une particule est un paramètre directement lié à la stabilité des solutions colloïdales, c'est un bon indicateur des interactions possibles entre particules. Selon la théorie DLVO, développée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek, la stabilité des particules en suspension dépend de l'énergie potentielle total d'interaction, Ep, qui correspond à la somme d'une énergie potentielle d'attraction dépendant des interactions de Van Der Waals (Ep_{vdw}) et d'une énergie potentielle de répulsion très largement dépendant des interactions électrostatiques dues aux charges des particules ($Ep_{élec}$) (Figure 6.7).

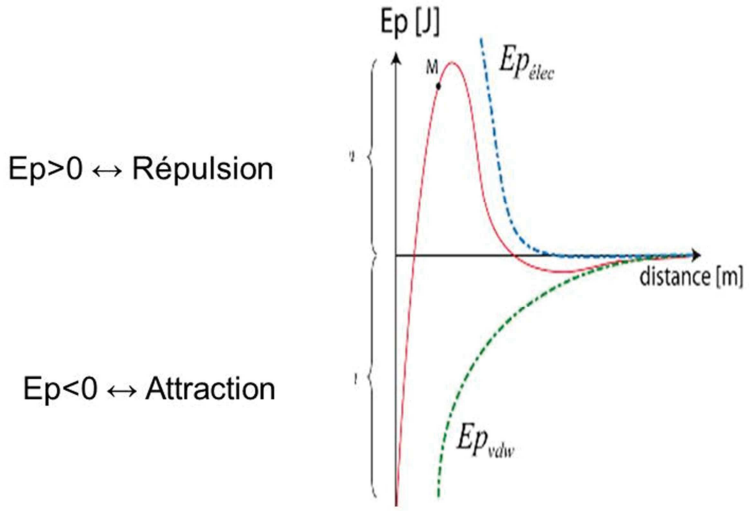


Figure 6.7 : Evolution des énergies potentielles d'interaction Ep, Ep_{vdw} et $Ep_{élec}$ d'un système de deux particules à distance. La courbe d'énergie potentielle totale présente deux zones attractives (aux courtes et longues distances) qui entoure une zone répulsive aussi appelée « barrière d'énergie » (distance moyenne) ou dominent les interactions électrostatiques. En dessous de cette barrière, les forces d'attraction sont plus fortes et les particules sont très proches ou agrégées. Globalement, des Ep >0 sont synonymes de forces répulsives et inversement pour des Ep <0.

La mesure du potentiel zêta permet donc de prévoir le comportement des solutions colloïdales et d'appréhender les phénomènes d'agrégation. En effet, les valeurs de

potentiel zêta comprises entre +25 mV et -25 mV définissent une zone d'instabilité au-delà de laquelle les solutions colloïdales sont électriquement stables (357).

Le potentiel zêta est déterminé par électrophorèse laser Doppler, c'est une technique qui mesure la mobilité électrophorétique c'est-à-dire les mouvements de particules chargés en solution sous l'influence d'un champ électrique. Les particules éclairées par une lumière laser diffusent cette lumière puis leur vitesse de déplacement entraîne un décalage de la fréquence de la lumière diffusée par effet Doppler.

Le potentiel zêta est directement proportionnel à la mobilité électrophorétique des particules à travers l'équation de Smoluchowski :

$$\zeta = (4 \eta \pi U) / \varepsilon \qquad \textbf{Equation 5}$$

- ζ est le potentiel zêta en V,
- ε la constante diélectrique en F/m [ou (kg m^2)/V^2 s^2 m],
- η la viscosité du milieu dispersant en Pa.s [ou (kg/(m s^2))/s],
- U la mobilité électrophorétique en m^2/V s définit par U = v / E, v étant la vitesse des particules en m/s et E le champ électrique en V/m.

Conditions expérimentales :

Le potentiel zêta est mesuré dans une cellule à capillaire replié, avec des électrodes intégrées (Malvern). La mesure se fait à 25°C sur des volumes compris entre 650 µl et 750 µl. La concentration en peptide formulé dans les particules est de 25 µM.

Tableau 6.2 : Corrélation des valeurs des potentiels zêta avec la stabilité colloïdale.

Potentiel zêta [mV]	Stabilité colloïdale
de 0 à ±5	Coagulation ou floculation rapide
de ±10 à ±30	Début d'instabilité
de ±30 à ±40	Stabilité modérée
de ±40 à ±60	Bonne stabilité
Plus que ±61	Excellente stabilité

Notes : Tableau selon (233).

5. Les techniques de Langmuir pour les mesures d'interface eau/air

Un film de Langmuir est une monocouche de molécules tensioactives à l'interface entre de l'eau (ou une solution aqueuse) et l'air notée eau/air. L'adsorption de molécules amphiphiles à la surface de l'eau donne naissance à un film monomoléculaire qui abaisse la tension de surface et a un effet stabilisateur de l'interface. On définit la pression de surface ∏ par la diminution de la tension de surface lorsqu'un film est adsorbé d'après l'équation :

$$\Pi = \gamma_{eau} - \gamma_{solution} \qquad \textbf{Equation 6}$$

où γ_{eau} et $\gamma_{solution}$ sont les tensions de surface lorsque l'interface est respectivement nue, ou en présence de molécules tensioactives.

La pression de surface Π est mesurée en permanence, dans notre cas grâce à un dispositif de type « lame de Wilhelmy » (238). Une des extrémités de la lame est plongée dans le liquide, l'autre est reliée à un capteur de force. Celui-ci exerce sur la lame une force verticale dirigée vers le bas. Le bilan des forces exercées sur la lame est schématisé sur la Figure 6.8 :

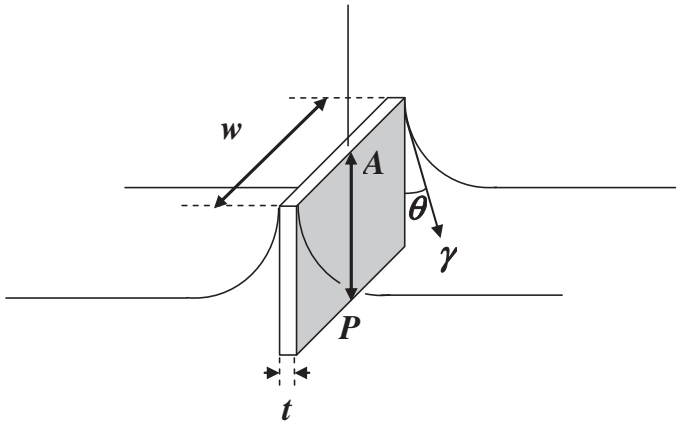


Figure 6.8 : Principe de la méthode de Wilhelmy. *P* est le poids de la lame, *A* la poussée d'Archimède, γ la tension superficielle et θ l'angle de contact entre la lame et la surface du liquide, w et t sont la largeur et l'épaisseur de la lame.

Les forces s'exerçant sur la lame sont : le poids *P* et la tension superficielle γ d'un côté et la poussée d'Archimède *A* de l'autre côté. La force résultante peut alors s'écrire :

$$F = P + 2\,\gamma\,(w + t)\cos\theta - A \qquad \textbf{Equation 7}$$

Les approximations suivantes permettent de simplifier l'équation 7 :

- *t* est négligeable devant *w*
- si la lame est suffisamment mouillée, l'angle de contact θ = 0 donc cos θ = 1

Soit :

$$F = P + 2\,\gamma\,w - A \qquad \textbf{Equation 8}$$

Si la composition de l'interface varie, *P* et *A* demeurent constants (la poussée *A* maintient la lame dans une position fixe) et donc :

$$\Delta F = 2\,w\,(\gamma_{solution} - \gamma_{eau}) = -2\,w\,\Pi \qquad \textbf{Equation 9}$$

et $$\Pi = -\Delta F / 2\,w \qquad \textbf{Equation 10}$$

Pour l'interface eau/air, la tension superficielle de l'eau est γ_{eau} = 72,8 mN/m à 20°C. Il est donc important que l'eau utilisé soit ultra pure pour que cette valeur soit conservée.

5.1. Les études d'adsorption

Les études d'adsorption vont permettre de déterminer le caractère amphipatique des peptides vecteurs étudiés. La capacité à s'adsorber à l'interface eau/air (= interface hydrophile/hydrophobe) dépend de la manière dont les résidus hydrophiles et hydrophobes sont placés tout le long du peptide : plus la séparation entre les deux types de résidus est nette, plus le caractère amphipathique est important. Les peptides se placent à l'interface avec les résidus hydrophiles dans l'eau et les résidus hydrophobes dans l'air. Les expérimentations sont réalisées en utilisant un système conçu au laboratoire où la pression superficielle Π est mesurée selon la méthode de la lame de platine de Wilhelmy (238). Les mesures sont effectuées à

l'équilibre après injection de différents aliquots de peptide en solution aqueuse (NaCl à 0,154 M) dans la sousphase (Figure 6.9).

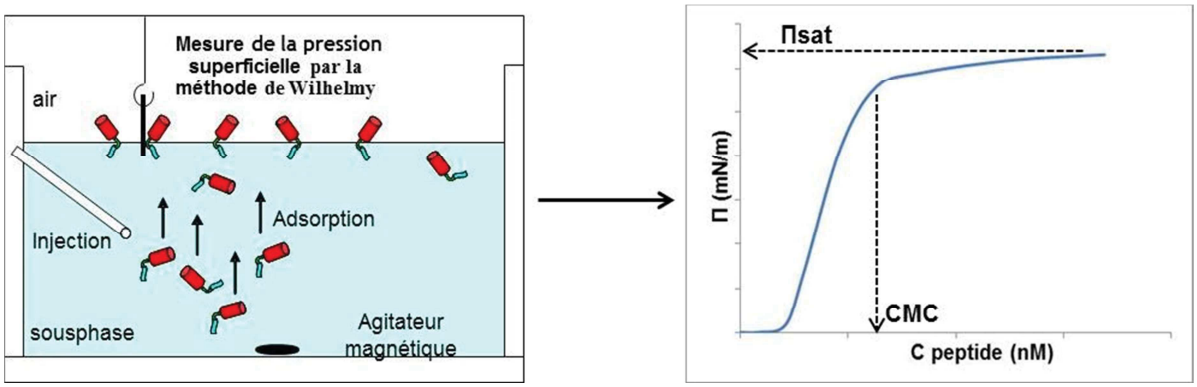


Figure 6.9: Principe d'une mesure d'adsorption d'un peptide à l'interface eau/air. Le tracé de la pression superficielle en fonction de la concentration de peptide en sous phase, Π=f(Cpeptide), donne accès à deux paramètres qualifiant le caractère amphipathique. L'interface eau/air est saturée en peptide lorsque l'on atteint deux valeurs spécifiques: la pression de saturation, Πsat, et la concentration micellaire critique, CMC.

L'homogénéisation de la solution est assurée par une agitation magnétique douce. Pour déterminer la concentration micellaire critique (CMC), la procédure est répétée jusqu'à obtention d'un équilibre caractérisé par une saturation de la pression superficielle, Πsat. La CMC est alors déterminée en traçant la pression superficielle Π en fonction de la concentration en peptide dans la sousphase.

***Conditions expérimentales* :**

Entre 0 et 100 µl d'une solution mère de peptide à une concentration voisine de 300 µM sont injectés dans une cuve de Langmuir en téflon d'une contenance de 71 ml (12x7 cm). L'augmentation de volume dans la cuve causé par l'ajout de peptide doit être inférieure à 0,15% car une augmentation trop importante pourrait modifier le niveau de l'interface sur la lame et conduire à des valeurs aberrantes. Le temps d'équilibrage entre chaque injection est de 30 minutes. Les mesures sont réalisées à température ambiante avec une résolution de 0,1 mN/m.

5.2. Les études d'insertion

Les études d'insertion permettent d'évaluer la capacité des peptides à interagir et s'insérer dans des monocouches de phospholipides. La monocouche de phospholipides est initialement formée par étalement d'une solution de lipides dissous dans un mélange chloroforme/méthanol (3/1, v/v) à l'interface eau/air (solution aqueuse de NaCl à 0,154 M) jusqu'à obtention d'une pression définie en lipides, Π_i ou pression initiale. En fonction de l'expérience, la solution de lipides peut contenir un seul type de phospholipide (DOPG) ou être un mélange (DOPC/SM/Chol). Après évaporation des solvants et stabilisation de la pression superficielle (~10-15 min), un petit volume de peptide en solution aqueuse est injecté dans la sousphase en dessous de la monocouche lipidique (Figure 6.10). Les augmentations de pression superficielle ($\Delta\Pi$) sont enregistrées pour différentes pressions initiales en lipide (Π_i) afin de déterminer les pressions maximales d'insertion (MIP pour *maximal insertion pressure*) des peptides pour chaque type de monocouche. A la valeur de MIP, il est considéré que le peptide ne peut plus s'insérer dans la monocouche de lipide (240,241).

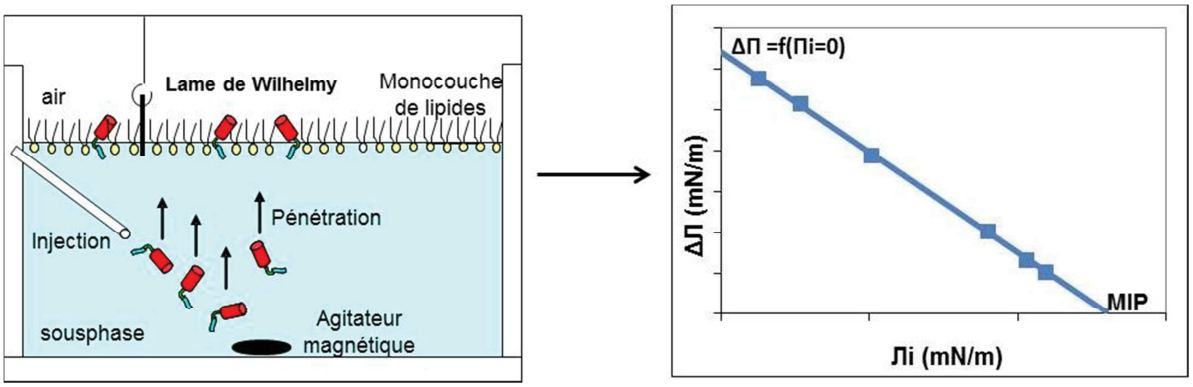


Figure 6.10: Principe d'une mesure d'insertion d'un peptide dans une monocouche lipidique préalablement étalée à l'interface eau/air. L'extrapolation de la droite de variation de pression en fonction de la pression initiale induite par la présence d'une monocouche de lipide, $\Delta\Pi = f(\Pi i)$ donne accès aux paramètres suivants : la pression maximale d'insertion, MIP, et la variation de pression correspondant à une pression initiale nulle ($\Delta\Pi = f(\Pi i=0)$. Cette valeur devant en théorie correspondre à la pression de saturation du peptide seul.

***Conditions expérimentales* :**

Un volume compris entre 1 µl et 10 µl d'une solution lipidique à 5 mg/ml est déposé goutte à goutte avec une seringue Hamilton à l'interface eau/air dans une cuve de Langmuir en téflon d'une contenance de 71 ml (12x7 cm). Après 10-15 min permettant l'évaporation du solvant et la consolidation de la monocouche, un volume de peptide est injecté en sous phase sous agitation magnétique. Le volume de peptide injecté ne doit pas induire une concentration de peptide en sousphase supérieure à la CMC déterminée dans le test d'adsorption pour éviter que le peptide ne soit dans une configuration de saturation de l'interface. L'expérience est réalisée à température ambiante.

6. Dichroïsme circulaire pour déterminer la conformation des CPPs

Le dichroïsme circulaire (CD pour *Circular Dichroism*) est une spectroscopie d'absorption dans l'UV proche et lointain qui donne des informations sur la structure des macromolécules biologiques (protéines ou peptides) en solution. Toute molécule optiquement active possède un dichroïsme circulaire. La lumière polarisée est constituée d'une lumière circulaire droite et d'une lumière circulaire gauche. Lorsqu'elle traverse un échantillon chiral les deux types de lumière (gauche et droite) sont absorbés différemment. Cette différence d'absorption correspond au spectre dichroïque. Chaque acide aminé naturel, à l'exception de la glycine, possède un carbone asymétrique. La présence de ces carbones chiraux est à l'origine de l'activité optique et donc du spectre de dichroïsme circulaire que possède une séquence peptidique. Cependant, le squelette peptidique (angles de torsion différents selon la structure secondaire) exerce une influence sur le profil du spectre CD. Le spectre obtenu est donc caractéristique des structures secondaires présentes dans un peptide ou dans une protéine (358,359)

Une hélice alpha (α) est caractérisée par trois extrema à 193 nm, 207 nm et 222 nm. Pour une hélice « droite », les deux extrema à 207 nm et 222nm sont des minima et celui à 193 nm est un maximum, tandis que pour une hélice « gauche », les extrema sont inversés (Figure 6.11). Les feuillets bêta (β) sont caractérisés par deux bandes

dont l'une est centrée à 215-218 nm et l'autre à 195 nm, respectivement négative et positive (Figure 6.11). Les peptides ou protéines sans structures secondaires particulières ou désordonnés sont caractérisées par un minimum vers 198 nm et une bande d'amplitude variable, positive ou négative, vers 220 nm (Figure 6.11). Les coudes β (non représentés dans la Figure 6.11) donnent lieu à une grande diversité de spectres rendant difficile leur interprétation. Néanmoins, le spectre d'une molécule structurée en coude β montre généralement deux bandes, une négative autour de 205 nm et une positive centrée autour de 220 nm. Enfin, la nature de la solution (pH, solvant, force ionique, …) ou la température peuvent influencer la conformation des peptides et modifier ainsi le spectre de dichroïsme circulaire.

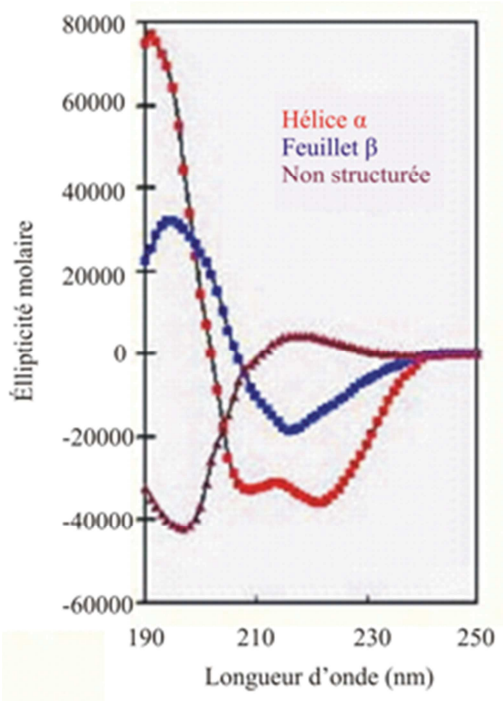


Figure 6.11: Pics caractéristiques des principales structures secondaires de protéines ou peptides en CD. L'allure des spectres de CD varie suivant le type de repliement en hélice α, feuillet β ou lorsqu'il n'y a pas de structure particulière.

***Conditions expérimentales* :**

Les expériences de CD sont effectuées sur un dichrographe Jasco 810 dans une cellule de quartz d'un trajet optique de 1 mm pour les peptides en solution aqueuse.

Les spectres dichroïques sont mesurés en présence ou non de différents partenaires : LUV et siRNA à différents ratios molaires lipide/peptide (r) et peptide/siRNA respectivement (R). Les spectres sont enregistrés entre 190 nm et 260 nm en effectuant la moyenne de plusieurs accumulations. Toutes les expériences sont réalisées à température ambiante.

La concentration du peptide est de 40 µM pour un volume utilisé de 200 µl, l'ajout de LUVs ou de siRNA dilue le peptide jusque 30 µM au minimum. Le siRNA et les LUVs étant optiquement actifs sur cette plage de longueur d'onde, le spectre du peptide est corrigé de la présence des LUV et du siRNA. Ensuite le spectre du peptide est recalculé en ellipticité molaire par résidu en fonction de la concentration et du nombre de résidus du peptide.

7. Mesure de l'activité biologique des CPP/siRNA *in cellulo*

7.1. Conditions de transfection des cellules

Pour valider l'activité biologique des différentes formulations de complexes, le peptide vecteur est formulé avec le siRNA luciférase puis mis en présence de cellules exprimant le gène codant la luciférase, comme la lignée de mélanome murin B16-Luc+ (B16-F10-Luc, transfection stable réalisée par V. Vives au CRBM). Le protocole de transfection utilisé est le suivant :

- Les cellules (20 000 cellules par puits) sont mises en culture dans une plaque de 96 puits à 37°C, 5% CO_2.
- Les complexes sont formés dans du DMEM sans sérum puis incubés pendant 30 min à 37°C, 5% CO_2.
- 24h après l'ensemencement, on incube les cellules avec les complexes (volume final de 100 µl) pendant 1 h à 37°C, 5% CO_2.
- Ensuite, du milieu complet (100 µl de DMEM, Lonza) contenant 20% de sérum (FBS, *Fetal Bovine Serum*, PAA), 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco) est ajouté aux cellules puis l'incubation est prolongée de 36h à 48 h (37°C, 5% CO_2) avant la mesure de la toxicité et de l'activité luciférase.

Les complexes formulés CPP/siRNA-Cyclin B et/ou CPP/siRNA-GAPDH ont été utilisés comme contrôle négatif ne montrant pas d'inhibition de l'expression de la luciférase.

7.2. Mesure de la toxicité cellulaire engendrée par les complexes

La lactate-deshydrogénase (LDH) est une enzyme importante dans le métabolisme des sucres qu'on retrouve dans différents types cellulaires. Cette enzyme est relargué dans le milieu extracellulaire lorsque la membrane plasmique est endommagée donc sa concentration peut être directement corrélée à la toxicité causée par les particules peptidiques. Son dosage s'effectue par une mesure d'absorbance grâce au kit « *Cytotoxicity Detection Kit LDH* » (Roche Diagnostics).

Pour chaque condition (3 puits/condition) 100 µl de surnageant sont prélevés et transvasés dans une nouvelle plaque de 96 puits à fond clair (Falcon). Chaque échantillon est traité d'après les recommandations du fournisseur, le taux de LDH étant finalement mesuré par absorption à 490 nm (Polarstar, BMG).

7.3. Mesure de l'activité luciférase

L'activité de la luciférase est mesurée à l'aide du kit *Luciferase Assay System* (Promega, France) selon les instructions du fournisseur. En bref, les cellules sont lysées avec 50 µl de PLB 0,5x (*Passive Lysis Buffer*, Promega, France) pendant 30 min (4°C sous agitation). Un volume de 20 à 30µL de lysat cellulaire est transvasé dans une plaque 96 puits blanche (Nunc), auxquels sont enfin ajoutés 100 µL de luciférine, provoquant une émission de lumière proportionnelle à la quantité de luciférase présente, afin de mesurer l'activité URL (Unité Relative de Lumière) par un luminomètre à plaque (Polarstar, BMG).

Afin de normaliser les résultats, l'émission de lumière est rapportée à celle des cellules contrôles, non traitées.

Une activité luciférase faible indique une inhibition importante de la transcription protéique (ou « *knock-down* »), et montre donc une efficacité de transfection considérable des CPP/siRNA-Luc.

Afin de pouvoir plus facilement comparer les effets biologiques des différentes nanoparticules, l'activité luciférase des cellules non-traitées est normalisée à 100%.

7.4. Internalisation des nanoparticules sur coupes de cerveau murin

Pour évaluer la capacité de PCY4 versus CADY à cibler le cerveau, nous avons tout d'abord voulu déterminer si PCY4 et CADY pouvaient pénétrer dans les neurones et pouvaient cibler une population particulière de cellules neuronales. Pour cela nous avons utilisé un modèle de tranches de cerveau vivantes (modèle se rapprochant de très près des conditions physiologiques in vivo tout en ayant la possibilité de tester de multiples conditions pour optimiser le protocole). Ce modèle consiste à incuber des tranches vivantes (non fixées, oxygénées et incubées dans un milieu équivalent au liquide céphalorachidien) de cerveau de souris avec les complexes puis visualiser par microscopie confocale la pénétration des complexes dans les neurones.

Conditions expérimentales :

Des souris C57BL/6 (10 semaines) sont anesthésiées (isofluorane) puis décapitées afin d'extraire le cerveau dans une solution de saccharose saturée en CO_2. Le cerveau est coupé en tranches de 200 µm (vibratome) qui sont par la suite incubé dans des plaques de 24 puits pendant 2 h avec les complexes CPP/siRNA (R=20, avec 10 nM de siRNA). Ensuite les tranches sont lavées, fixées et incubées avec des anticorps spécifiques des cellules neuronales (mouse anti-NeuN (1/500) + Alexa488-anti-mouse (1/500)) ainsi que du DAPI (1/10,000) pour le marquage des noyaux. A la fin de l'immuno-marquage, les tranches sont montées sur des lames (vectashield hard set) pour la microscopie confocale (Plateforme MRI du CRBM).

8. Microscopie pour la visualisation des nanoparticules

8.1. Microscopie à force atomique

Le principe de la microscopie à force atomique ou AFM (pour *Atomic Force Microscopy*) consiste à balayer la surface d'un échantillon avec une pointe en nitrure de silicium afin de détecter et visualiser les déviations occasionnées par l'interaction de la pointe avec la surface en termes de force. L'échantillon est placé sur un tube piézo-électrique (Figure 6.12). Un microlevier portant la pointe est placé au voisinage de l'échantillon de telle sorte que la pointe soit au contact ou à quelques Angströms de la surface. Le microlevier devant être fixe par rapport au détecteur, le balayage, à la différence de la plupart des microscopes optiques, consiste à déplacer l'objet et non la sonde. Le balayage est piloté par un micro-ordinateur qui contrôle le tube piézo-électrique. Le détecteur, quant à lui, est constitué d'un faisceau laser dirigé sur la pointe et réfléchi vers une photodiode à quatre quadrants (pour la détection des déplacements latéraux et transversaux du microlevier) ou à deux quadrants (détection des déplacements transversaux seulement). Ainsi, les déviations en hauteur induites par l'interaction pointe/surface permettent de suivre la topographie de l'échantillon. L'enregistrement de ces déviations selon deux directions de balayage permet de reconstituer l'image de la surface de l'échantillon.

L'AFM peut être employée sous vide ou en atmosphère ambiante. La pointe et l'échantillon peuvent également être recouverts d'une solution permettant ainsi de réaliser des expériences dans des conditions physiologiques (AFM sur cellules vivantes par exemple). L'AFM peut être utilisée selon différents modes pour produire des types d'images différents ; le mode « hauteur constante » où l'information de hauteur est traduite sous forme d'une force appliquée et le mode « force constante » autrement appelé mode « contact » qui permet d'éviter les fortes déviations. La résolution obtenue par AFM est 10 à 100 fois plus élevée que celle obtenue par microscopie électronique.

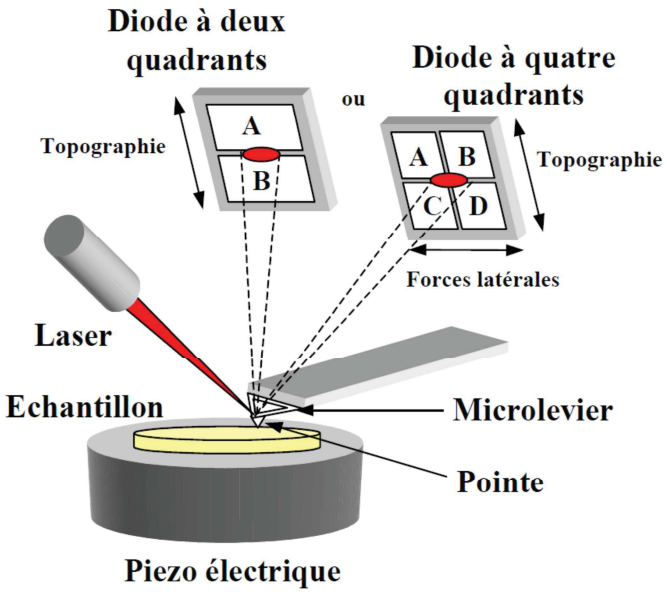


Figure 6.12 : Schéma représentant les principaux éléments constituant un microscope à force atomique.

Conditions expérimentales :

Les mesures d'AFM ont été faites en collaboration avec l'équipe du Dr. P-E Milhiet (CBS, Montpellier). Les échantillons de CADY/siRNA à R=40 ont été formulés dans un solvant à 25 mM HEPES, 150 mM NaCl tamponné à pH=7,4, puis déposés sur du mica, une feuille de roche pure permettant près clivage d'obtenir une surface parfaitement plane. Les expériences ont été réalisées en mode oscillant à l'air, c'est-à-dire que l'on mesure les variations de l'amplitude d'oscillation de la pointe pour restituer la topographie de l'échantillon. L'expérience est réalisée à l'aide d'un AFM multimode équipé d'un Nanoscope V controller (NanoBrucker) (360). L'image AFM a été réalisée avec un microlevier AC160TS (Olympus).

8.2. Microscopie électronique

Un microscope électronique est un microscope qui utilise un faisceau de particules d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie. Son mode de fonctionnement est similaire à la façon dont un microscope optique utilise

des lentilles en verre pour converger la lumière. Cependant les grossissements obtenus avec le microscope électronique sont nettement supérieurs, allant jusqu'à 5 millions de fois contre 2000 fois avec un microscope optique.

Il existe plusieurs sortes de microscopes électroniques. Les plus connus sont le microscope électronique en transmission (MET), qui est la forme originale du microscope électronique, et le microscope électronique à balayage (MEB).

En traversant l'échantillon, le faisceau d'électrons incident interagit avec la matière et donne naissance à plusieurs types de rayonnement comme indiqué sur la Figure 6.13 :

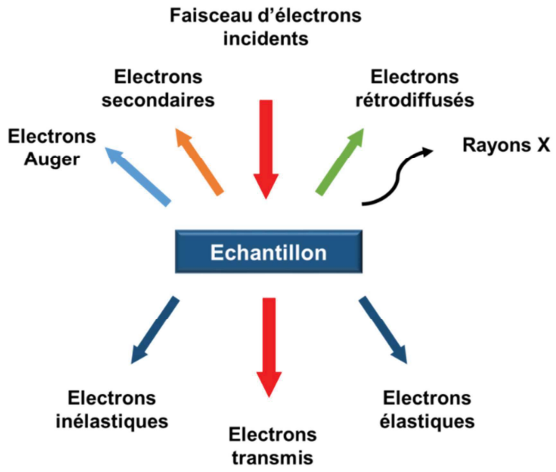


Figure 6.13 : Schéma des interactions entre le faisceau électronique incident et l'échantillon.

Une partie du faisceau d'électrons incident est transmise sans interaction et une partie est diffusée de façon élastique ou inélastique (Figure 6.13). Ce sont ces électrons diffusés de manière élastique ou inélastique qui participent à la formation de l'image en microscopie à transmission (MET).

Un MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. Ce sont les électrons secondaires provenant de l'ionisation d'atomes proches du faisceau incident qui sont généralement utilisé en MEB (Figure 6.13).

L'atome ionisé revenant à son état fondamental peut lui aussi émettre un rayonnement X.

Conditions expérimentales :

Les images de microscopie électronique à balayage ont été faites en collaboration avec l'équipe du Dr. Munoz-Garcia (CENIM-CSIC, Madrid) avec un MEB 6500L (JEOL). Les échantillons doivent être propres et exempts de toute trace d'eau. Les particules CADY/siRNA ont été formulées dans l'eau aux ratios molaires R=20 et R=40 puis déposées sur des grilles dédiées à l'imagerie par microscope électronique avant la réalisation des images.

Références bibliographiques

1. Scholzová E, Malík R, Ševčík J, Kleibl Z. RNA regulation and cancer development. Cancer Lett. 8 févr 2007;246(1–2):12‑23.

2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 19 févr 1998;391(6669):806‑11.

3. Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci. 22 déc 1998;95(26):15502‑7.

4. Mello CC, Conte D. Revealing the world of RNA interference. Nature. 16 sept 2004;431(7006):338‑42.

5. Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. Gene. 1 avr 2014;538(2):217‑27.

6. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 24 mai 2001;411(6836):494‑8.

7. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat Genet. sept 2002;32(1):107‑8.

8. Couzin J. Small RNAs Make Big Splash. Science. 20 déc 2002;298(5602):2296‑7.

9. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nat Rev Drug Discov. févr 2009;8(2):129‑38.

10. Wang J, Lu Z, Wientjes MG, Au JL-S. Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. AAPS J. 11 juin 2010;12(4):492‑503.

11. Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. Nat Mater. nov 2013;12(11):967‑77.

12. Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. Nat Rev Drug Discov. avr 2004;3(4):318‑29.

13. Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. avr 2005;11(4):RA110‑21.

14. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. Nat Rev Genet. août 2014;15(8):541‑55.

15. Bretscher MS. Membrane structure: some general principles. Science. 17 août 1973;181(4100):622‑9.

16. Vist MR, Davis JH. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. Biochemistry (Mosc). 16 janv 1990;29(2):451‑64.

17. Pasenkiewicz-Gierula M, Subczynski WK, Kusumi A. Influence of phospholipid unsaturation on the cholesterol distribution in membranes. Biochimie. oct 1991;73(10):1311‑6.

18. Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M. Ordering effects of cholesterol and its analogues. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. janv 2009;1788(1):97‑121.

19. Cress AE, Gerner EW. Cholesterol levels inversely reflect the thermal sensitivity of mammalian cells in culture. Nature. 14 févr 1980;283(5748):677‑9.

20. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 18 févr 1972;175(4023):720‑31.

21. Sharom FJ. Flipping and flopping—lipids on the move. IUBMB Life. 1 sept 2011;63(9):736‑46.

22. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. oct 2000;1(1):31‑9.

23. Nicolson GL. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. juin 2014;1838(6):1451‑66.

24. Smythe E, Warren G. The mechanism of receptor-mediated endocytosis. Eur J Biochem. 1 déc 1991;202(3):689‑99.

25. Li L, Chin L-S. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. Cell Mol Life Sci CMLS. mai 2003;60(5):942‑60.

26. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 6 mars 2003;422(6927):37‑44.

27. Taniyama Y, Azuma J, Kunugiza Y, Iekushi K, Rakugi H, Morishita R. Therapeutic Option of Plasmid-DNA Based Gene Transfer. Curr Top Med Chem. 1 oct 2012;12(15):1630‑7.

28. Deng Y, Yao F, Li J, Mao Z, Hu P, Long L, et al. RACK1 Suppresses Gastric Tumorigenesis by Stabilizing the β-Catenin Destruction Complex. Gastroenterology. avr 2012;142(4):812‑23.e15.

29. Hama S, Arata M, Nakamura I, Kasetani T, Itakura S, Tsuchiya H, et al. Prevention of tumor growth by needle-free jet injection of anti-C7orf24 siRNA. Cancer Gene Ther. août 2012;19(8):553‑7.

30. Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. Biotechnol Read Mass. 1992;24:384‑6.

31. Kim TW, Lee J-H, He L, Boyd DAK, Hardwick JM, Hung C-F, et al. Modification of Professional Antigen-Presenting Cells with Small Interfering RNA In vivo to Enhance Cancer Vaccine Potency. Cancer Res. 1 janv 2005;65(1):309‑16.

32. Li L, Shen H, Li A, Zhang Z, Wang B, Wang J, et al. Inhibition of hepatitis B virus (HBV) gene expression and replication by HBx gene silencing in a hydrodynamic injection mouse model with a new clone of HBV genotype B. Virol J. 28 juin 2013;10(1):214.

33. Coster HGL. A Quantitative Analysis of the Voltage-Current Relationships of Fixed Charge Membranes and the Associated Property of « Punch-Through ». Biophys J. sept 1965;5(5):669‑86.

34. Chabot S, Pelofy S, Teissié J, Golzio M. Delivery of RNAi-Based Oligonucleotides by Electropermeabilization. Pharmaceuticals. 10 avr 2013;6(4):510‑21.

35. Chabot S, Orio J, Castanier R, Bellard E, Nielsen SJ, Golzio M, et al. LNA-based Oligonucleotide Electrotransfer for miRNA Inhibition. Mol Ther. août 2012;20(8):1590‑8.

36. Stephens DJ, Pepperkok R. The many ways to cross the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci. 10 avr 2001;98(8):4295‑8.

37. Lokhandwalla M, Sturtevant B. Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (SWL): I. Analysis of cell deformation due to SWL flow-fields. Phys Med Biol. 1 févr 2001;46(2):413.

38. Rychak JJ, Klibanov AL. Nucleic acid delivery with microbubbles and ultrasound. Adv Drug Deliv Rev. 15 juin 2014;72:82‑93.

39. Wang L, Zhang M, Tan K, Guo Y, Tong H, Fan X, et al. Preparation of Nanobubbles Carrying Androgen Receptor siRNA and Their Inhibitory Effects on Androgen-Independent Prostate Cancer when Combined with Ultrasonic Irradiation. Culig Z, éditeur. PLoS ONE. 5 mai 2014;9(5):e96586.

40. Yoshida M, Kawakami S, Un K, Kono Y, Higuchi Y, Yamashita F, et al. Evaluation of inflammatory responses due to small interfering RNA transfer using unmodified- and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure in primary cultured macrophages. J Drug Target. 15 mai 2014;22(8):732‑8.

41. Escoffre J-M, Zeghimi A, Novell A, Bouakaz A. In-Vivo Gene Delivery by Sonoporation: Recent Progress and Prospects. Curr Gene Ther. 1 déc 2012;13(1):2‑14.

42. Clark IB, Hanania EG, Stevens J, Gallina M, Fieck A, Brandes R, et al. Optoinjection for efficient targeted delivery of a broad range of compounds and macromolecules into diverse cell types. J Biomed Opt. 2006;11(1):014034‑014034 ‑ 8.

43. Stevenson DJ, Gunn-Moore FJ, Campbell P, Dholakia K. Single cell optical transfection. J R Soc Interface. 6 juin 2010;7(47):863‑71.

44. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral Vectors for Gene Therapy. Pharmacol Ther. oct 1998;80(1):35‑47.

45. Wang Q, Lv Y, Diao Y, Xu R. The Design of Vectors for RNAi Delivery System. Curr Pharm Des. 1 mai 2008;14(13):1327‑40.

46. Peng Z. Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. Hum Gene Ther. 1 sept 2005;16(9):1016‑27.

47. Ferreira V, Petry H, Salmon F. Immune responses to AAV-vectors, the Glybera example from bench to bedside. Microb Immunol. 2014;5:82.

48. Muruve DA. The Innate Immune Response to Adenovirus Vectors. Hum Gene Ther. 1 déc 2004;15(12):1157‑66.

49. Wang XY, Martiniello-Wilks R, Shaw JM, Ho T, Coulston N, Cooke-Yarborough C, et al. Preclinical evaluation of a prostate-targeted gene-directed enzyme prodrug therapy delivered by ovine atadenovirus. Gene Ther. 2 sept 2004;11(21):1559‑67.

50. Hofmann C, Löser P, Cichon G, Arnold W, Both GW, Strauss M. Ovine Adenovirus Vectors Overcome Preexisting Humoral Immunity against Human Adenoviruses In Vivo. J Virol. 8 janv 1999;73(8):6930‑6.

51. Crystal RG. Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. Hum Gene Ther. 1 janv 2014;25(1):3‑11.

52. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. EMBO J. mai 1993;12(5):2099‑108.

53. Marin M, Noël D, Valsesia-Wittman S, Brockly F, Etienne-Julan M, Russell S, et al. Targeted infection of human cells via major histocompatibility complex class I molecules by Moloney murine leukemia virus-derived viruses displaying single-chain antibody fragment-envelope fusion proteins. J Virol. 5 janv 1996;70(5):2957‑62.

54. Sharma S, Murai F, Miyanohara A, Friedmann T. Noninfectious virus-like particles produced by Moloney murine leukemia virus-based retrovirus

packaging cells deficient in viral envelope become infectious in the presence of lipofection reagents. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 sept 1997;94(20):10803-8.

55. Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Lee HT, Choi HJ, Kim J-H, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. Mol Reprod Dev. 1 août 2004;68(4):429-34.

56. Gu H, MD KR, éditeurs. Introduction of Genes Into Primary Murine Splenic B Cells Using Retrovirus Vectors - Springer. Humana Press; 2004 [cité 26 févr 2015]. Disponible sur: http://link.springer.com.gate1.inist.fr/protocol/10.1385%2F1-59259-796-3%3A139

57. Hacein-Bey-Abina S, Kalle CV, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. Science. 17 oct 2003;302(5644):415-9.

58. Brough DE, Hsu C, Kulesa VA, Lee GM, Cantolupo LJ, Lizonova A, et al. Activation of transgene expression by early region 4 is responsible for a high level of persistent transgene expression from adenovirus vectors in vivo. J Virol. déc 1997;71(12):9206-13.

59. Drouin LM, Agbandje-McKenna M. Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. Future Virol. déc 2013;8(12):1183-99.

60. Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, et al. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. Nat Med. janv 1999;5(1):56-63.

61. Athanasopoulos T, Graham IR, Foster H, Dickson G. Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). Gene Ther. 2004;11(S1):S109-21.

62. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. Int J Pharm. 1 janv 2014;459(1–2):70-83.

63. Videira M, Arranja A, Rafael D, Gaspar R. Preclinical development of siRNA therapeutics: Towards the match between fundamental science and engineered systems. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. mai 2014;10(4):689-702.

64. Gulino A. Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. Int J Nanomedicine. juill 2012;3637.

65. Chang H-I, Yeh M-K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. Int J Nanomedicine. 2012;7:49-60.

66. Barenholz Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. J Control Release Off J Control Release Soc. 10 juin 2012;160(2):117‑34.

67. Foged C. siRNA delivery with lipid-based systems: promises and pitfalls. Curr Top Med Chem. 2012;12(2):97‑107.

68. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci U S A. nov 1987;84(21):7413.

69. Swaney WP. The effect of cationic liposome pretreatment and centrifugation on retrovirus-mediated gene transfer. Publ Online 04 Dec 1997 Doi101038sjgt3300529 [Internet]. 4 déc 1997 [cité 27 févr 2015];4(12). Disponible sur: http://www.nature.com.gate1.inist.fr/gt/journal/v4/n12/abs/3300529a.html

70. Williford J-M, Wu J, Ren Y, Archang MM, Leong KW, Mao H-Q. Recent Advances in Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery. Annu Rev Biomed Eng. 2014;16(1):347‑70.

71. Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. The Lancet. 4 juin 2010;375(9729):1896‑905.

72. Scognamiglio I, Di Martino MT, Campani V, Virgilio A, Galeone A, Gullà A, et al. Transferrin-Conjugated SNALPs Encapsulating 2′-O-Methylated miR-34a for the Treatment of Multiple Myeloma. BioMed Res Int. 2014;2014:1‑7.

73. Ferrari S, Moro E, Pettenazzo A, Behr JP, Zacchello F, Scarpa M. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. Gene Ther. oct 1997;4(10):1100‑6.

74. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 août 1995;92(16):7297‑301.

75. Höbel S, Aigner A. Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2010;623:283‑97.

76. Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. J Gene Med. mai 2005;7(5):657‑63.

77. Roesler S, Koch FPV, Schmehl T, Weissmann N, Seeger W, Gessler T, et al. Amphiphilic, low molecular weight poly(ethylene imine) derivatives with enhanced stability for efficient pulmonary gene delivery. J Gene Med. févr 2011;13(2):123‑33.

78. Merdan T, Kunath K, Fischer D, Kopecek J, Kissel T. Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. Pharm Res. févr 2002;19(2):140‑6.

79. Fajac I, Allo JC, Souil E, Merten M, Pichon C, Figarella C, et al. Histidylated polylysine as a synthetic vector for gene transfer into immortalized cystic fibrosis airway surface and airway gland serous cells. J Gene Med. oct 2000;2(5):368‑78.

80. Eliyahu H, Barenholz Y, Domb AJ. Polymers for DNA Delivery. Molecules. 31 janv 2005;10(1):34‑64.

81. Shcharbin D, Shakhbazau A, Bryszewska M. Poly(amidoamine) dendrimer complexes as a platform for gene delivery. Expert Opin Drug Deliv. 30 oct 2013;10(12):1687‑98.

82. Liu X, Wu J, Yammine M, Zhou J, Posocco P, Viel S, et al. Structurally flexible triethanolamine core PAMAM dendrimers are effective nanovectors for DNA transfection in vitro and in vivo to the mouse thymus. Bioconjug Chem. 21 déc 2011;22(12):2461‑73.

83. Zhou Y, Zhang C, Liang W. Development of RNAi technology for targeted therapy — A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. J Controlled Release [Internet]. [cité 19 juill 2014]; Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914002776

84. Sano A, Maeda M, Nagahara S, Ochiya T, Honma K, Itoh H, et al. Atelocollagen for protein and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 28 nov 2003;55(12):1651‑77.

85. Ballarín-González B, Ebbesen MF, Howard KA. Polycation-based nanoparticles for RNAi-mediated cancer treatment. Cancer Lett. 28 sept 2014;352(1):66‑80.

86. Ragelle H, Vandermeulen G, Préat V. Chitosan-based siRNA delivery systems. J Controlled Release. 28 nov 2013;172(1):207‑18.

87. Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. Adv Drug Deliv Rev. 31 janv 2010;62(1):12‑27.

88. Hasegawa M, Yagi K, Iwakawa S, Hirai M. Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells. Jpn J Cancer Res Gann. avr 2001;92(4):459‑66.

89. Yousefi A, Storm G, Schiffelers R, Mastrobattista E. Trends in polymeric delivery of nucleic acids to tumors. J Controlled Release. 10 sept 2013;170(2):209‑18.

90. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. Chem Soc Rev. juin 2009;38(6):1759‑82.

91. Gautier J, Allard-Vannier E, Hervé-Aubert K, Soucé M, Chourpa I. Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications. Nanotechnology. 1 nov 2013;24(43):432002.

92. Draz MS, Fang BA, Zhang P, Hu Z, Gu S, Weng KC, et al. Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections. Theranostics. 2014;4(9):872‑92.

93. Shu Y, Pi F, Sharma A, Rajabi M, Haque F, Shu D, et al. Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev. févr 2014;66:74‑89.

94. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell. 23 déc 1988;55(6):1189‑93.

95. Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. Cell. 23 déc 1988;55(6):1179‑88.

96. Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. Proc Natl Acad Sci. 3 janv 1991;88(5):1864‑8.

97. Pooga M, Hällbrink M, Zorko M, Uuml, Langel L. Cell penetration by transportan. FASEB J. 1 janv 1998;12(1):67‑77.

98. Jones AT, Sayers EJ. Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs. J Controlled Release. 20 juill 2012;161(2):582‑91.

99. Farkhani SM, Valizadeh A, Karami H, Mohammadi S, Sohrabi N, Badrzadeh F. Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. Peptides. juill 2014;57:78‑94.

100. Reissmann S. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. J Pept Sci. 1 oct 2014;20(10):760‑84.

101. Schwarze SR, Dowdy SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. Trends Pharmacol Sci. 1 févr 2000;21(2):45‑8.

102. Langel U, Lindgren M. Handbook of Cell-Penetrating Peptides, Second Edition. CRC Press; 2006. 624 p.

103. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. J Biol Chem. 4 août 1994;269(14):10444‑50.

104. Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. J Biol Chem. 20 juin 1997;272(25):16010‑7.

105. Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, et al. Homeodomain-DNA recognition. Cell. 29 juill 1994;78(2):211‑23.

106. Christiaens B, Grooten J, Reusens M, Joliot A, Goethals M, Vandekerckhove J, et al. Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides. Eur J Biochem FEBS. mars 2004;271(6):1187‑97.

107. Prochiantz A. Homeodomain-Derived Peptides: In and Out of the Cells. Ann N Y Acad Sci. 1 déc 1999;886(1):172‑9.

108. Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. J Biol Chem. 26 juill 1996;271(30):18188‑93.

109. Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, et al. Arginine-rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. J Biol Chem. 23 févr 2001;276(8):5836‑40.

110. Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. Proc Natl Acad Sci. 21 nov 2000;97(24):13003‑8.

111. Vivès E, Granier C, Prevot P, Lebleu B. Structure activity relationship study of the plasma membrane translocating potential of a short peptide from HIV-1 tat protein. Letters in peptide science. 1997;429‑36.

112. Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. Proc Natl Acad Sci. 21 nov 2000;97(24):13003‑8.

113. Elmquist A, Lindgren M, Bartfai T, Langel Ü. VE-Cadherin-Derived Cell-Penetrating Peptide, pVEC, with Carrier Functions. Exp Cell Res. 1 oct 2001;269(2):237‑44.

114. Suresh A, Kim Y-C. Translocation of cell penetrating peptides on Chlamydomonas reinhardtii. Biotechnol Bioeng. 1 oct 2013;110(10):2795‑801.

115. Chugh A, Eudes F. Cellular uptake of cell-penetrating peptides pVEC and transportan in plants. J Pept Sci. 1 avr 2008;14(4):477‑81.

116. Nan YH, Park I-S, Hahm K-S, Shin SY. Antimicrobial activity, bactericidal mechanism and LPS-neutralizing activity of the cell-penetrating peptide pVEC and its analogs. J Pept Sci. 1 déc 2011;17(12):812‑7.

117. Neundorf I, Rennert R, Franke J, Közle I, Bergmann R. Detailed Analysis Concerning the Biodistribution and Metabolism of Human Calcitonin-Derived Cell-Penetrating Peptides. Bioconjug Chem. 1 août 2008;19(8):1596‑603.

118. Schmidt MC, Rothen-Rutishauser B, Rist B, Beck-Sickinger A, Wunderli-Allenspach H, Rubas W, et al. Translocation of Human Calcitonin in Respiratory Nasal Epithelium Is Associated with Self-Assembly in Lipid Membrane. Biochemistry (Mosc). 1 nov 1998;37(47):16582‑90.

119. Krauss U, Kratz F, Beck-Sickinger AG. Novel daunorubicin-carrier peptide conjugates derived from human calcitonin segments. J Mol Recognit. 1 sept 2003;16(5):280‑7.

120. Rennert R, Neundorf I, Beck-Sickinger AG. Synthesis and Application of Peptides as Drug Carriers. In: Mayer G, éditeur. Nucleic Acid and Peptide Aptamers [Internet]. Humana Press; 2009 [cité 20 oct 2014]. p. 389‑403. Disponible sur: http://link.springer.com.gate1.inist.fr/protocol/10.1007/978-1-59745-557-2_22

121. Machova Z, Mühle C, Krauss U, Tréhin R, Koch A, Merkle HP, et al. Cellular Internalization of Enhanced Green Fluorescent Protein Ligated to a Human Calcitonin-Based Carrier Peptide. ChemBioChem. 3 juill 2002;3(7):672‑7.

122. Tréhin R, Krauss U, Muff R, Meinecke M, Beck-Sickinger AG, Merkle HP. Cellular internalization of human calcitonin derived peptides in MDCK monolayers: a comparative study with Tat(47-57) and penetratin(43-58). Pharm Res. janv 2004;21(1):33‑42.

123. Säälik P, Padari K, Niinep A, Lorents A, Hansen M, Jokitalo E, et al. Protein Delivery with Transportans Is Mediated by Caveolae Rather Than Flotillin-Dependent Pathways. Bioconjug Chem. 20 mai 2009;20(5):877‑87.

124. Muratovska A, Eccles MR. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. FEBS Lett. 30 janv 2004;558(1-3):63‑8.

125. Lindberg M, Jarvet J, Langel Ü, Gräslund A. Secondary Structure and Position of the Cell-Penetrating Peptide Transportan in SDS Micelles As Determined by NMR†. Biochemistry (Mosc). 1 mars 2001;40(10):3141‑9.

126. Soomets U, Lindgren M, Gallet X, Hällbrink M, Elmquist A, Balaspiri L, et al. Deletion analogues of transportan. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 31 juill 2000;1467(1):165‑76.

127. Langel Ü, éditeur. Application of PepFect Peptides for the Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides - Springer. Humana Press; 2011 [cité 24 févr 2015]. Disponible sur: http://link.springer.com.gate1.inist.fr/protocol/10.1007%2F978-1-60761-919-2_26

128. Oskolkov N, Arukuusk P, Copolovici D-M, Lindberg S, Margus H, Padari K, et al. NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. Int J Pept Res Ther. 18 mai 2011;17(2):147‑57.

129. Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. J Pept Res. nov 2000;56(5):318‑25.

130. Abes R, Arzumanov AA, Moulton HM, Abes S, Ivanova GD, Iversen PL, et al. Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview. Biochem Soc Trans. 1 août 2007;35(4):775.

131. Fuchs SM, Raines RT. Internalization of cationic peptides: the road less (or more?) traveled. Cell Mol Life Sci CMLS. 20 juill 2006;63(16):1819‑22.

132. Lacey JC, Pruitt KM. Drug-biomolecule interactions: interactions of mononucleotides and polybasic amino acids. J Pharm Sci. mars 1975;64(3):473‑7.

133. Chen L, Wright LR, Chen C-H, Oliver SF, Wender PA, Mochly-Rosen D. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective ϵPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R7. Chem Biol. déc 2001;8(12):1123‑9.

134. Chen L, Hahn H, Wu G, Chen C-H, Liron T, Schechtman D, et al. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of δPKC and εPKC. Proc Natl Acad Sci. 25 sept 2001;98(20):11114‑9.

135. Rothbard JB, Garlington S, Lin Q, Kirschberg T, Kreider E, McGrane PL, et al. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. Nat Med. nov 2000;6(11):1253‑7.

136. Jin LH, Bahn JH, Eum WS, Kwon HY, Jang SH, Han KH, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. Free Radic Biol Med. 1 déc 2001;31(11):1509‑19.

137. Futaki S, Ohashi W, Suzuki T, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, et al. Stearylated Arginine-Rich Peptides: A New Class of Transfection Systems. Bioconjug Chem. 1 nov 2001;12(6):1005‑11.

138. Oehlke J, Krause E, Wiesner B, Beyermann M, Bienert M. Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic β-sheet forming peptide. FEBS Lett. 29 sept 1997;415(2):196‑9.

139. Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klauschenz E, et al. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. Biochim Biophys Acta. 11 nov 1998;1414(1-2):127-39.

140. Scheller A, Oehlke J, Wiesner B, Dathe M, Krause E, Beyermann M, et al. Structural requirements for cellular uptake of alpha-helical amphipathic peptides. J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc. avr 1999;5(4):185-94.

141. Oehlke J, Wallukat G, Wolf Y, Ehrlich A, Wiesner B, Berger H, et al. Enhancement of intracellular concentration and biological activity of PNA after conjugation with a cell-penetrating synthetic model peptide. Eur J Biochem. 1 juill 2004;271(14):3043-9.

142. Kenien R, Zaro JL, Shen W-C. MAP-mediated nuclear delivery of a cargo protein. J Drug Target. 9 janv 2012;20(4):329-37.

143. Mo RH, Zaro JL, Shen W-C. Comparison of Cationic and Amphipathic Cell Penetrating Peptides for siRNA Delivery and Efficacy. Mol Pharm. 6 févr 2012;9(2):299-309.

144. Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today. août 2012;17(15–16):850-60.

145. Tünnemann G, Ter-Avetisyan G, Martin RM, Stöckl M, Herrmann A, Cardoso MC. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. J Pept Sci. 1 avr 2008;14(4):469-76.

146. Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, et al. Arginine-rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. J Biol Chem. 23 févr 2001;276(8):5836-40.

147. Prochiantz A. Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. Curr Opin Neurobiol. oct 1996;6(5):629-34.

148. Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. Nucleic Acids Res. 7 janv 1997;25(14):2730-6.

149. Deshayes S, Heitz A, Morris MC, Charnet P, Divita G, Heitz F. Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis†. Biochemistry (Mosc). 1 févr 2004;43(6):1449-57.

150. Johansson HJ, El-Andaloussi S, Holm T, Mäe M, Jänes J, Maimets T, et al. Characterization of a Novel Cytotoxic Cell-penetrating Peptide Derived From p14ARF Protein. Mol Ther. 6 nov 2007;16(1):115-23.

151. Oglęcka K, Lundberg P, Magzoub M, Göran Eriksson LE, Langel Ü, Gräslund A. Relevance of the N-terminal NLS-like sequence of the prion protein for membrane perturbation effects. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. janv 2008;1778(1):206‑13.

152. Crombez L, Aldrian-Herrada G, Konate K, Nguyen QN, McMaster GK, Brasseur R, et al. A New Potent Secondary Amphipathic Cell–penetrating Peptide for siRNA Delivery Into Mammalian Cells. Mol Ther. janv 2009;17(1):95‑103.

153. Konate K, Crombez L, Deshayes S, Decaffmeyer M, Thomas A, Brasseur R, et al. Insight into the Cellular Uptake Mechanism of a Secondary Amphipathic Cell-Penetrating Peptide for siRNA Delivery. Biochemistry (Mosc). 27 avr 2010;49(16):3393‑402.

154. Oess S. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. Publ Online 02 May 2000 Doi101038sjgt3301154 [Internet]. 2 mai 2000 [cité 27 févr 2015];7(9). Disponible sur: http://www.nature.com.gate1.inist.fr/gt/journal/v7/n9/full/3301154a.html

155. Gao S, Simon MJ, Hue CD, Morrison B, Banta S. An unusual cell penetrating peptide identified using a plasmid display-based functional selection platform. ACS Chem Biol. 20 mai 2011;6(5):484‑91.

156. Geli MI, Torrent M, Ludevid D. Two Structural Domains Mediate Two Sequential Events in [gamma]-Zein Targeting: Protein Endoplasmic Reticulum Retention and Protein Body Formation. Plant Cell Online. 1 déc 1994;6(12):1911‑22.

157. Pujals S, Sabidó E, Tarragó T, Giralt E. all-D proline-rich cell-penetrating peptides: a preliminary in vivo internalization study. Biochem Soc Trans. 1 août 2007;35(4):794.

158. Sadler K, Eom KD, Yang J-L, Dimitrova Y, Tam JP. Translocating Proline-Rich Peptides from the Antimicrobial Peptide Bactenecin 7†. Biochemistry (Mosc). 1 déc 2002;41(48):14150‑7.

159. Daniels DS, Schepartz A. Intrinsically Cell-Permeable Miniature Proteins Based on a Minimal Cationic PPII Motif. J Am Chem Soc. 1 nov 2007;129(47):14578‑9.

160. Smith BA, Daniels DS, Coplin AE, Jordan GE, McGregor LM, Schepartz A. Minimally Cationic Cell-Permeable Miniature Proteins via α-Helical Arginine Display. J Am Chem Soc. 1 mars 2008;130(10):2948‑9.

161. Oehlke J, Birth P, Klauschenz E, Wiesner B, Beyermann M, Oksche A, et al. Cellular uptake of antisense oligonucleotides after complexing or conjugation with cell-penetrating model peptides. Eur J Biochem. 1 août 2002;269(16):4025‑32.

162. Li W, Nicol F, Szoka Jr. FC. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 23 avr 2004;56(7):967‑85.

163. Taylor BN, Mehta RR, Yamada T, Lekmine F, Christov K, Chakrabarty AM, et al. Noncationic Peptides Obtained From Azurin Preferentially Enter Cancer Cells. Cancer Res. 15 janv 2009;69(2):537‑46.

164. Martín I, Teixidó M, Giralt E. Design, Synthesis and Characterization of a New Anionic Cell-Penetrating Peptide: SAP(E). ChemBioChem. 11 avr 2011;12(6):896‑903.

165. Marks JR, Placone J, Hristova K, Wimley WC. Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening. J Am Chem Soc. 15 juin 2011;133(23):8995‑9004.

166. Kamide. Isolation of novel cell-penetrating peptides from a random peptide library using in vitro virus and their modifications. Int J Mol Med [Internet]. 19 nov 2009 [cité 27 févr 2015];25(01). Disponible sur: http://www.spandidos-publications.com/ijmm/25/1/41

167. Schafmeister CE, Po J, Verdine GL. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. J Am Chem Soc. 1 juin 2000;122(24):5891‑2.

168. Ochocki JD, Mullen DG, Wattenberg EV, Distefano MD. Evaluation of a cell penetrating prenylated peptide lacking an intrinsic fluorophore via in situ click reaction. Bioorg Med Chem Lett. 1 sept 2011;21(17):4998‑5001.

169. Covic L, Misra M, Badar J, Singh C, Kuliopulos A. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. Nat Med. oct 2002;8(10):1161‑5.

170. Järver P, Coursindel T, Andaloussi SE, Godfrey C, Wood MJ, Gait MJ. Peptide-mediated Cell and In Vivo Delivery of Antisense Oligonucleotides and siRNA. Mol Ther — Nucleic Acids. 12 juin 2012;1(6):e27.

171. Abes S, Turner JJ, Ivanova GD, Owen D, Williams D, Arzumanov A, et al. Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. Nucleic Acids Res. 7 janv 2007;35(13):4495‑502.

172. Tyagi P, Banerjee R, Basu S, Yoshimura N, Chancellor M, Huang L. Intravesical Antisense Therapy for Cystitis Using TAT-Peptide Nucleic Acid Conjugates. Mol Pharm. 1 août 2006;3(4):398‑406.

173. Abes R, Moulton HM, Clair P, Yang S-T, Abes S, Melikov K, et al. Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)4 peptides: structure-activity studies. Nucleic Acids Res. 1 nov 2008;36(20):6343‑54.

174. Snyder EL, Dowdy SF. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids invivo. Expert Opin Drug Deliv. 1 janv 2005;2(1):43‑51.

175. Morris MC, Chaloin L, Méry J, Heitz F, Divita G. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. Nucleic Acids Res. 9 janv 1999;27(17):3510‑7.

176. Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. Nat Biotechnol. déc 2001;19(12):1173‑6.

177. Meade BR, Dowdy SF. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. Adv Drug Deliv Rev. 30 mars 2007;59(2–3):134‑40.

178. Kim C, Lee Y, Kim JS, Jeong JH, Park TG. Thermally Triggered Cellular Uptake of Quantum Dots Immobilized with Poly(N-isopropylacrylamide) and Cell Penetrating Peptide. Langmuir. 21 sept 2010;26(18):14965‑9.

179. Lundberg P, El-Andaloussi S, Sütlü T, Johansson H, Langel Ü. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. FASEB J. 9 janv 2007;21(11):2664‑71.

180. Said Hassane F, Abes R, EL Andaloussi S, Lehto T, Sillard R, Langel Ü, et al. Insights into the cellular trafficking of splice redirecting oligonucleotides complexed with chemically modified cell-penetrating peptides. J Controlled Release. 30 juill 2011;153(2):163‑72.

181. Van Asbeck AH, Beyerle A, McNeill H, Bovee-Geurts PHM, Lindberg S, Verdurmen WPR, et al. Molecular Parameters of siRNA–Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for Efficient Cellular Delivery. ACS Nano. 28 mai 2013;7(5):3797‑807.

182. Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R. A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. Traffic. 1 juill 2007;8(7):848‑66.

183. Brooks H, Lebleu B, Vivès E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. Adv Drug Deliv Rev. 28 févr 2005;57(4):559‑77.

184. Kaplan IM, Wadia JS, Dowdy SF. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. J Controlled Release. 20 janv 2005;102(1):247‑53.

185. Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? FEBS Lett. 19 juin 2013;587(12):1693‑702.

186. Koren E, Torchilin VP. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. Trends Mol Med. juill 2012;18(7):385‑93.

187. Säälik P, Elmquist A, Hansen M, Padari K, Saar K, Viht K, et al. Protein Cargo Delivery Properties of Cell-Penetrating Peptides. A Comparative Study. Bioconjug Chem. 1 nov 2004;15(6):1246‑53.

188. Ter-Avetisyan G, Tünnemann G, Nowak D, Nitschke M, Herrmann A, Drab M, et al. Cell Entry of Arginine-rich Peptides Is Independent of Endocytosis. J Biol Chem. 2 juin 2009;284(6):3370‑8.

189. Jones SW, Christison R, Bundell K, Voyce CJ, Brockbank SMV, Newham P, et al. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. Br J Pharmacol. août 2005;145(8):1093‑102.

190. El-Sayed A, Futaki S, Harashima H. Delivery of Macromolecules Using Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Ways to Overcome Endosomal Entrapment. AAPS J. 1 mars 2009;11(1):13‑22.

191. Endoh T, Ohtsuki T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. Adv Drug Deliv Rev. 25 juill 2009;61(9):704‑9.

192. Erazo-Oliveras A, Muthukrishnan N, Baker R, Wang T-Y, Pellois J-P. Improving the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides and Their Cargos: Strategies and Challenges. Pharmaceuticals. 1 nov 2012;5(11):1177‑209.

193. Letoha T, Gaál S, Somlai C, Czajlik A, Perczel A, Penke B. Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines. J Mol Recognit. 1 sept 2003;16(5):272‑9.

194. Hirose H, Takeuchi T, Osakada H, Pujals S, Katayama S, Nakase I, et al. Transient Focal Membrane Deformation Induced by Arginine-rich Peptides Leads to Their Direct Penetration into Cells. Mol Ther. mai 2012;20(5):984‑93.

195. Lamazière A, Burlina F, Wolf C, Chassaing G, Trugnan G, Ayala-Sanmartin J. Non-Metabolic Membrane Tubulation and Permeability Induced by Bioactive Peptides. PLoS ONE. 14 févr 2007;2(2):e201.

196. Afonin S, Frey A, Bayerl S, Fischer D, Wadhwani P, Weinkauf S, et al. The Cell-Penetrating Peptide TAT(48-60) Induces a Non-Lamellar Phase in DMPC Membranes. ChemPhysChem. 13 oct 2006;7(10):2134‑42.

197. Beevers AJ, Dixon AM. Helical membrane peptides to modulate cell function. Chem Soc Rev. 25 mai 2010;39(6):2146‑57.

198. Di Pisa M, Chassaing G, Swiecicki J-M. Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers. Biochemistry (Mosc). 2014;54(2):194‑207.

199. Joanne P, Galanth C, Goasdoué N, Nicolas P, Sagan S, Lavielle S, et al. Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. sept 2009;1788(9):1772‑81.

200. Walrant A, Vogel A, Correia I, Lequin O, Olausson BES, Desbat B, et al. Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. juill 2012;1818(7):1755‑63.

201. Walrant A, Correia I, Jiao C-Y, Lequin O, Bent EH, Goasdoué N, et al. Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. janv 2011;1808(1):382‑93.

202. Deshayes S, Morris M, Heitz F, Divita G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. Adv Drug Deliv Rev. 1 mars 2008;60(4–5):537‑47.

203. Herce HD, Garcia AE, Litt J, Kane RS, Martin P, Enrique N, et al. Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane, Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. Biophys J. 7 oct 2009;97(7):1917‑25.

204. Eiríksdóttir E, Konate K, Langel Ü, Divita G, Deshayes S. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. juin 2010;1798(6):1119‑28.

205. Palm-Apergi C, Lorents A, Padari K, Pooga M, Hällbrink M. The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. FASEB J. 1 janv 2009;23(1):214‑23.

206. Ziegler A, Seelig J. Binding and Clustering of Glycosaminoglycans: A Common Property of Mono- and Multivalent Cell-Penetrating Compounds. Biophys J. 15 mars 2008;94(6):2142‑9.

207. Poon GMK, Gariépy J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. Biochem Soc Trans. 1 août 2007;35(4):788.

208. Lundin P, Johansson H, Guterstam P, Holm T, Hansen M, Langel Ü, et al. Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates. Bioconjug Chem. 17 déc 2008;19(12):2535‑42.

209. Ziegler A, Seelig J. Contributions of Glycosaminoglycan Binding and Clustering to the Biological Uptake of the Nonamphipathic Cell-Penetrating Peptide WR9. Biochemistry (Mosc). 31 mai 2011;50(21):4650‑64.

210. Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. Biol Cell. 1 avr 2008;100(4):201‑17.

211. Letoha T, Keller-Pintér A, Kusz E, Kolozsi C, Bozsó Z, Tóth G, et al. Cell-penetrating peptide exploited syndecans. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. déc 2010;1798(12):2258‑65.

212. Nakase I, Takeuchi T, Tanaka G, Futaki S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. Adv Drug Deliv Rev. 1 mars 2008;60(4–5):598‑607.

213. Ezzat K, Helmfors H, Tudoran O, Juks C, Lindberg S, Padari K, et al. Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. FASEB J. 3 janv 2012;26(3):1172‑80.

214. Chaloin L. Synthetic primary amphipayhic peptides as tools for the cellular import of drugs and nucleic acids. Curr Top Pept Protein Res. 1999;

215. Simeoni F, Morris MC, Heitz F, Divita G. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. Nucleic Acids Res. 6 janv 2003;31(11):2717‑24.

216. Morris KV, Chan SW-L, Jacobsen SE, Looney DJ. Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. Science. 27 août 2004;305(5688):1289‑92.

217. Crombez L, Morris MC, Dufort S, Aldrian-Herrada G, Nguyen Q, Master GM, et al. Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. Nucleic Acids Res. 8 janv 2009;37(14):4559‑69.

218. Rittner K, Benavente A, Bompard-Sorlet A, Heitz F, Divita G, Brasseur R, et al. New Basic Membrane-Destabilizing Peptides for Plasmid-Based Gene Delivery in Vitro and in Vivo. Mol Ther. févr 2002;5(2):104‑14.

219. Kurzawa L, Pellerano M, Morris MC. PEP and CADY-mediated delivery of fluorescent peptides and proteins into living cells. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. déc 2010;1798(12):2274‑85.

220. Deshayes S, Konate K, Aldrian G, Crombez L, Heitz F, Divita G. Structural polymorphism of non-covalent peptide-based delivery systems: highway to cellular uptake. Biochim Biophys Acta. déc 2010;1798(12):2304‑14.

221. Sioud M. Overcoming the Challenges of siRNA Activation of Innate Immunity: Design Better Therapeutic siRNAs. In: Sioud M, éditeur. RNA Interference [Internet]. Springer New York; 2015 [cité 12 nov 2014]. p. 301‑19. Disponible sur: http://link.springer.com.gate1.inist.fr/protocol/10.1007/978-1-4939-1538-5_19

222. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference. Nature. 16 nov 2000;408(6810):325‑30.

223. Mickan A, Sarko D, Haberkorn U, Mier W. Rational Design of CPP-based Drug Delivery Systems: Considerations from Pharmacokinetics. Curr Pharm Biotechnol. 31 août 2014;15(3):200‑9.

224. Moschos SA, Williams AE, Lindsay MA. Cell-penetrating-peptide-mediated siRNA lung delivery. Biochem Soc Trans. 1 août 2007;35(4):807.

225. El-Andaloussi S, Holm T, Langel U. Cell-Penetrating Peptides: Mechanisms and Applications. Curr Pharm Des. 1 nov 2005;11(28):3597‑611.

226. Nasrollahi SA, Taghibiglou C, Azizi E, Farboud ES. Cell-penetrating peptides as a novel transdermal drug delivery system. Chem Biol Drug Des. nov 2012;80(5):639‑46.

227. Gautam A, Chaudhary K, Kumar R, Sharma A, Kapoor P, Tyagi A, et al. In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. J Transl Med. 2013;11(1):74.

228. Crowet J-M, Lins L, Deshayes S, Divita G, Morris M, Brasseur R, et al. Modeling of non-covalent complexes of the cell-penetrating peptide CADY and its siRNA cargo. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. févr 2013;1828(2):499‑509.

229. Thomas A, Deshayes S, Decaffmeyer M, Van Eyck M-H, Charloteaux BB, Brasseur R. PepLook: an innovative in silico tool for determination of structure, polymorphism and stability of peptides. Adv Exp Med Biol. 2009;611:459‑60.

230. McKenzie DL, Kwok KY, Rice KG. A Potent New Class of Reductively Activated Peptide Gene Delivery Agents. J Biol Chem. 4 juill 2000;275(14):9970‑7.

231. Gallivan JP, Dougherty DA. Cation-π interactions in structural biology. Proc Natl Acad Sci. 17 août 1999;96(17):9459‑64.

232. Millefiori S, Alparone A, Millefiori A, Vanella A. Electronic and vibrational polarizabilities of the twenty naturally occurring amino acids. Biophys Chem. févr 2008;132(2–3):139‑47.

233. Hanaor D, Michelazzi M, Leonelli C, Sorrell CC. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO2. J Eur Ceram Soc. janv 2012;32(1):235‑44.

234. Konate K, Rydstrom A, Divita G, Deshayes S. Everything You Always Wanted to Know About CADY-Mediated siRNA Delivery* (* But Afraid to Ask). Curr Pharm Des. 1 mars 2013;19(16):2869‑77.

235. Martin SR, Schilstra MJ. Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules. In: Dr. John J. Correia and Dr. H. William Detrich I, éditeur. Methods in Cell Biology [Internet]. Academic Press; 2008 [cité 26 déc 2014]. p. 263‑93. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X07840106

236. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics. 10 août 2005;1751(2):119‑39.

237. Choi Y, David A. Cell Penetrating Peptides and the Mechanisms for Intracellular Entry. Curr Pharm Biotechnol. 31 août 2014;15(3):192‑9.

238. Maget-Dana R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 15 déc 1999;1462(1–2):109‑40.

239. Demel RA, Geurts van Kessel WSM, Zwaal RFA, Roelofsen B, van Deenen LLM. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 16 sept 1975;406(1):97‑107.

240. Brockman H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? Curr Opin Struct Biol. août 1999;9(4):438‑43.

241. Calvez P, Bussières S, Éric Demers, Salesse C. Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. Biochimie. juin 2009;91(6):718‑33.

242. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. Mol Pharm. 4 août 2008;5(4):505‑15.

243. Joshi MD, Patravale V, Prabhu R. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. Int J Nanomedicine. févr 2015;1001.

244. Spencer DS, Puranik AS, Peppas NA. Intelligent Nanoparticles for Advanced Drug Delivery in Cancer Treatment. Curr Opin Chem Eng. févr 2015;7:84‑92.

245. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. Mater Sci Eng C. 1 août 2014;41:178‑95.

246. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. J Controlled Release. 28 févr 2015;200:138‑57.

247. Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li S-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. J Controlled Release. 28 déc 2013;172(3):782‑94.

248. Jafari M, Xu W, Pan R, Sweeting CM, Karunaratne DN, Chen P. Serum Stability and Physicochemical Characterization of a Novel Amphipathic Peptide C6M1 for SiRNA Delivery. PLoS ONE. 15 mai 2014;9(5):e97797.

249. Pippa N, Mariaki M, Pispas S, Demetzos C. Preparation, development and in vitro release evaluation of amphotericin B–loaded amphiphilic block copolymer vectors. Int J Pharm. 1 oct 2014;473(1–2):80‑6.

250. Robins M, Fillery-Travis A. Colloidal dispersions. Edited by W. B. Russel, D. A. Saville & W. R. Schowalter, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989, xvii + 506 pp., price: £60.00. ISBN 0 521 34188 4. J Chem Technol Biotechnol. 1992;54(2):201‑2.

251. Israelachvili JN. Intermolecular and surface forces / Jacob N. Israelachvili. London ; San Diego: Academic Press; 1991.

252. Gooding M, Browne LP, Quinteiro FM, Selwood DL. siRNA Delivery: From Lipids to Cell-penetrating Peptides and Their Mimics. Chem Biol Drug Des. 1 déc 2012;80(6):787‑809.

253. Stanzl EG, Trantow BM, Vargas JR, Wender PA. Fifteen Years of Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters: Basic Science, Research Tools, and Clinical Applications. Acc Chem Res. 2013;46(12):2944‑54.

254. Pramanick. Excipient for Parenteral formulations [Internet]. 2013 [cité 6 janv 2015]. Disponible sur: https://www.academia.edu/4320620/Excipient_for_Parenteral_formulations

255. Tang C-H, Shen L. Role of Conformational Flexibility in the Emulsifying Properties of Bovine Serum Albumin. J Agric Food Chem. 2013;61(12):3097‑110.

256. Fleischer CC, Payne CK. Nanoparticle–Cell Interactions: Molecular Structure of the Protein Corona and Cellular Outcomes. Acc Chem Res. 2014;47(8):2651‑9.

257. Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. Chem Rev. 2011;111(9):5610‑37.

258. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. Adv Drug Deliv Rev. 30 déc 2006;58(15):1688‑713.

259. Deshayes S, Konate K, Rydström A, Crombez L, Godefroy C, Milhiet P-E, et al. Self-assembling peptide-based nanoparticles for siRNA delivery in primary cell lines. Small Weinh Bergstr Ger. 23 juill 2012;8(14):2184‑8.

260. Menezes MJ, McClenahan FK, Leiton CV, Aranmolate A, Shan X, Colognato H. The extracellular matrix protein laminin α2 regulates the maturation and function of the blood-brain barrier. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 12 nov 2014;34(46):15260‑80.

261. Ren T, Yu S, Mao Z, Moya SE, Han L, Gao C. Complementary Density Gradient of Poly(hydroxyethyl methacrylate) and YIGSR Selectively Guides Migration of Endotheliocytes. Biomacromolecules. 2014;15(6):2256‑64.

262. Ren T, Yu S, Mao Z, Moya SE, Han L, Gao C. Complementary Density Gradient of Poly(hydroxyethyl methacrylate) and YIGSR Selectively Guides Migration of Endotheliocytes. Biomacromolecules. 2014;15(6):2256‑64.

263. Kikkawa Y, Hozumi K, Katagiri F, Nomizu M, Kleinman HK, Koblinski JE. Laminin-111-derived peptides and cancer. Cell Adhes Migr. févr 2013;7(1):150‑256.

264. Iwamoto Y, Nomizu M, Yamada Y, Ito Y, Tanaka K, Sugioka Y. Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR). Br J Cancer. mars 1996;73(5):589‑95.

265. Yu H, Zhang L, Yang J, Das UN, Shen S. Effect of laminin tyrosine-isoleucine-glycine-serine-arginine peptide on the growth of human prostate cancer (PC-3) cells in vitro. Eur J Pharmacol. 15 août 2009;616(1-3):251‑5.

266. González-Valdez J, Rito-Palomares M, Benavides J. Advances and trends in the design, analysis, and characterization of polymer–protein conjugates for « PEGylaided » bioprocesses. Anal Bioanal Chem. 26 févr 2012;403(8):2225‑35.

267. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nat Rev Drug Discov. mars 2003;2(3):214‑21.

268. Bhadra D, Bhadra S, Jain P, Jain NK. Pegnology: a review of PEG-ylated systems. Pharm. janv 2002;57(1):5‑29.

269. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: A strategy for overcoming the PEG dilemma. Adv Drug Deliv Rev. 18 mars 2011;63(3):152‑60.

270. Prokop A. Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications. Springer Science & Business Media; 2011. 871 p.

271. Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Smart Materials for Drug Delivery. Royal Society of Chemistry; 2013. 419 p.

272. Touitou E, Barry BW. Enhancement in Drug Delivery. CRC Press; 2006. 631 p.

273. Rydström A, Deshayes S, Konate K, Crombez L, Padari K, Boukhaddaoui H, et al. Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles. PloS One. 2011;6(10):e25924.

274. Anko M, Majhenc J, Kogej K, Sillard R, Langel Ü, Anderluh G, et al. Influence of stearyl and trifluoromethylquinoline modifications of the cell penetrating

peptide TP10 on its interaction with a lipid membrane. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. mars 2012;1818(3):915‑24.

275. Kim WJ, Christensen LV, Jo S, Yockman JW, Jeong JH, Kim Y-H, et al. Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma. Mol Ther. sept 2006;14(3):343‑50.

276. Jafari M, Karunaratne DN, Sweeting CM, Chen P. Modification of a Designed Amphipathic Cell-Penetrating Peptide and Its Effect on Solubility, Secondary Structure, and Uptake Efficiency. Biochemistry (Mosc). 2013;52(20):3428‑35.

277. White SH, Wimley WC. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr. 10 nov 1998;1376(3):339‑52.

278. Yau W-M, Wimley WC, Gawrisch K, White SH. The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces. Biochemistry (Mosc). 1998;37(42):14713‑8.

279. Hu W, Lee KC, Cross TA. Tryptophans in membrane proteins: indole ring orientations and functional implications in the gramicidin channel. Biochemistry (Mosc). 13 juill 1993;32(27):7035‑47.

280. Thorén PEG, Persson D, Lincoln P, Nordén B. Membrane destabilizing properties of cell-penetrating peptides. Biophys Chem. 22 avr 2005;114(2-3):169‑79.

281. Rydberg HA, Matson M, Amand HL, Esbjörner EK, Nordén B. Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides. Biochemistry (Mosc). 10 juill 2012;51(27):5531‑9.

282. Bechara C, Pallerla M, Burlina F, Illien F, Cribier S, Sagan S. Massive glycosaminoglycan-dependent entry of Trp-containing cell-penetrating peptides induced by exogenous sphingomyelinase or cholesterol depletion. Cell Mol Life Sci CMLS. févr 2015;72(4):809‑20.

283. Jobin M-L, Blanchet M, Henry S, Chaignepain S, Manigand C, Castano S, et al. The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. févr 2015;1848(2):593‑602.

284. Wang F, Wang Y, Zhang X, Zhang W, Guo S, Jin F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. J Controlled Release. 28 janv 2014;174:126‑36.

285. Trabulo S, L. Cardoso A, M. S. Cardoso A, M. Morais C, S. Jurado A, C. Pedroso de Lima M. Cell-penetrating Peptides as Nucleic Acid Delivery Systems: From Biophysics to Biological Applications. Curr Pharm Des. 1 mars 2013;19(16):2895‑923.

286. Madani F, Lindberg S, Langel &#220, lo, Futaki S, Gr&#228, et al. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. J Biophys. 7 avr 2011;2011:e414729.

287. Esbjörner EK, Lincoln P, Nordén B. Counterion-mediated membrane penetration: Cationic cell-penetrating peptides overcome Born energy barrier by ion-pairing with phospholipids. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. juin 2007;1768(6):1550‑8.

288. Wydro P. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol monolayers – analysis of the interactions in model membranes and Brewster Angle Microscopy experiments. Colloids Surf B Biointerfaces. 1 mai 2012;93:174‑9.

289. Wydro P. The influence of cholesterol on multicomponent Langmuir monolayers imitating outer and inner leaflet of human erythrocyte membrane. Colloids Surf B Biointerfaces. 1 mars 2013;103:67‑74.

290. Friedrich CL, Rozek A, Patrzykat A, Hancock REW. Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria. J Biol Chem. 29 juin 2001;276(26):24015‑22.

291. Clark PL, Liu ZP, Zhang J, Gierasch LM. Intrinsic tryptophans of CRABPI as probes of structure and folding. Protein Sci Publ Protein Soc. juin 1996;5(6):1108‑17.

292. Andrushchenko VV, Vogel HJ, Prenner EJ. Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. oct 2006;1758(10):1596‑608.

293. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Biochim Biophys Acta. 13 juin 1986;858(1):161‑8.

294. Valencia PM, Farokhzad OC, Karnik R, Langer R. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. Nat Nanotechnol. oct 2012;7(10):623‑9.

295. Hung LH, Lee AP. Microfluidic Devices for the Synthesis of Nanoparticles and Biomaterials. 2007.

296. Kundu AK, Chandra PK, Hazari S, Ledet G, Pramar YV, Dash S, et al. Stability of lyophilized siRNA nanosome formulations. Int J Pharm. 28 févr 2012;423(2):525‑34.

297. Kang HC, Huh KM, Bae YH. Polymeric nucleic acid carriers: current issues and novel design approaches. J Controlled Release. 28 déc 2012;164(3):256‑64.

298. Ezzat K, Zaghloul EM, EL Andaloussi S, Lehto T, El-Sayed R, Magdy T, et al. Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and

their stability in simulated gastric conditions. J Controlled Release. 20 août 2012;162(1):1‑8.

299. McCarthy HO, McCaffrey J, McCrudden CM, Zholobenko A, Ali AA, McBride JW, et al. Development and characterization of self-assembling nanoparticles using a bio-inspired amphipathic peptide for gene delivery. J Controlled Release. 10 sept 2014;189:141‑9.

300. Coffin MD, McGinity JW. Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly(D,L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles in aqueous media. Pharm Res. févr 1992;9(2):200‑5.

301. Cervos Navarro J. [ELECTRON MICROSCOPIC FINDINGS IN THE CAPILLARIES OF THE CEREBRAL CORTEX]. Arch Für Psychiatr Nervenkrankh. 18 sept 1963;204:484‑504.

302. Hawkins BT, Davis TP. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. Pharmacol Rev. 6 janv 2005;57(2):173‑85.

303. Kang T, Gao X, Chen J. Harnessing the Capacity of Cell-Penetrating Peptides for Drug Delivery to the Central Nervous System. Curr Pharm Biotechnol. 31 août 2014;15(3):220‑30.

304. Zou L-L, Ma J-L, Wang T, Yang T-B, Liu C-B. Cell-Penetrating Peptide-Mediated Therapeutic Molecule Delivery into the Central Nervous System. Curr Neuropharmacol. mars 2013;11(2):197‑208.

305. Lee SH, Castagner B, Leroux J-C. Is there a future for cell-penetrating peptides in oligonucleotide delivery? Eur J Pharm Biopharm. sept 2013;85(1):5‑11.

306. Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung K-E, Hee Kim M, Davidson BL, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. Nature. 5 juill 2007;448(7149):39‑43.

307. Ren X, Guo X, Chen L, Guo M, Peng N, Li R. Attenuated migration by green tea extract (–)-epigallocatechin gallate (EGCG): involvement of 67 kDa laminin receptor internalization in macrophagic cells. Food Funct. 24 juill 2014;5(8):1915‑9.

308. Kanazawa T. Brain delivery of small interfering ribonucleic acid and drugs through intranasal administration with nano-sized polymer micelles. Med Devices Auckl NZ. 6 janv 2015;8:57‑64.

309. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. J Pharm Sci. 1 avr 2010;99(4):1654‑73.

310. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible

implications for biological impacts. Proc Natl Acad Sci. 23 sept 2008;105(38):14265‑70.

311. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. Pharmacol Rev. 6 janv 2001;53(2):283‑318.

312. Lindberg S, Regberg J, Eriksson J, Helmfors H, Muñoz-Alarcón A, Srimanee A, et al. A convergent uptake route for peptide- and polymer-based nucleotide delivery systems. J Controlled Release. 28 mai 2015;206:58‑66.

313. Andaloussi SE, Lehto T, Mäger I, Rosenthal-Aizman K, Oprea II, Simonson OE, et al. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. Nucleic Acids Res. 5 janv 2011;39(9):3972‑87.

314. Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, Chiu GNC, Shu Y, Li WM, et al. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). Biosci Rep. avr 2002;22(2):225‑50.

315. Hebeish A, El-Bisi MK, El-Shafei A. Green synthesis of silver nanoparticles and their application to cotton fabrics. Int J Biol Macromol. janv 2015;72:1384‑90.

316. Calleja P, Espuelas S, Vauthier C, Ponchel G, Irache JM. Controlled Release, Intestinal Transport, and Oral Bioavailablity of Paclitaxel can be Considerably Increased Using Suitably Tailored Pegylated Poly(Anhydride) Nanoparticles. J Pharm Sci. 19 janv 2015;

317. Jiang S-P, He S-N, Li Y-L, Feng D-L, Lu X-Y, Du Y-Z, et al. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. Int J Nanomedicine. 2013;8:3141‑50.

318. Wong BS, Yoong SL, Jagusiak A, Panczyk T, Ho HK, Ang WH, et al. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. Adv Drug Deliv Rev. déc 2013;65(15):1964‑2015.

319. Park SM, Cha JM, Nam J, Kim MS, Park S-J, Park ES, et al. Formulation optimization and in vivo proof-of-concept study of thermosensitive liposomes balanced by phospholipid, elastin-like polypeptide, and cholesterol. PloS One. 2014;9(7):e103116.

320. Zhang J, Li C, Zhang X, Huo S, Jin S, An F-F, et al. In vivo tumor-targeted dual-modal fluorescence/CT imaging using a nanoprobe co-loaded with an aggregation-induced emission dye and gold nanoparticles. Biomaterials. févr 2015;42:103‑11.

321. Ruggiero E, Hernández-Gil J, Mareque-Rivas JC, Salassa L. Near infrared activation of an anticancer Pt(IV) complex by Tm-doped upconversion nanoparticles. Chem Commun Camb Engl. 7 févr 2015;51(11):2091‑4.

322. Sharma AR, Kundu SK, Nam J-S, Sharma G, Priya Doss CG, Lee S-S, et al. Next Generation Delivery System for Proteins and Genes of Therapeutic Purpose: Why and How? BioMed Res Int [Internet]. 2014 [cité 1 mars 2015];2014. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4122142/

323. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. Nanomed. juin 2011;6(4):715‑28.

324. Duncan R. Polymer therapeutics: Top 10 selling pharmaceuticals — What next? J Controlled Release. 28 sept 2014;190:371‑80.

325. Rabanel J-M, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. J Controlled Release. 10 juill 2014;185:71‑87.

326. Lee SH, Moroz E, Castagner B, Leroux J-C. Activatable Cell Penetrating Peptide–Peptide Nucleic Acid Conjugate via Reduction of Azobenzene PEG Chains. J Am Chem Soc. 17 sept 2014;136(37):12868‑71.

327. Morris MC, Gros E, Aldrian-Herrada G, Choob M, Archdeacon J, Heitz F, et al. A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. Nucleic Acids Res. 4 janv 2007;35(7):e49.

328. Judge A, McClintock K, Phelps JR, MacLachlan I. Hypersensitivity and Loss of Disease Site Targeting Caused by Antibody Responses to PEGylated Liposomes. Mol Ther. févr 2006;13(2):328‑37.

329. Saadati R, Dadashzadeh S, Abbasian Z, Soleimanjahi H. Accelerated Blood Clearance of PEGylated PLGA Nanoparticles Following Repeated Injections: Effects of Polymer Dose, PEG Coating, and Encapsulated Anticancer Drug. Pharm Res. 27 nov 2012;30(4):985‑95.

330. Hashimoto Y, Uehara Y, Abu Lila AS, Ishida T, Kiwada H. Activation of TLR9 by incorporated pDNA within PEG-coated lipoplex enhances anti-PEG IgM production. Gene Ther. juin 2014;21(6):593‑8.

331. Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. J Controlled Release. 28 nov 2013;172(1):38‑47.

332. Candolfi M, Kroeger KM, Xiong W, Liu C, Puntel M, Yagiz K, et al. Targeted toxins for glioblastoma multiforme: pre-clinical studies and clinical implementation. Anticancer Agents Med Chem. oct 2011;11(8):729‑38.

333. Debinski W, Slagle B, Gibo DM, Powers SK, Gillespie GY. Expression of a restrictive receptor for interleukin 13 is associated with glial transformation. J Neurooncol. juin 2000;48(2):103‑11.