

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :
Marie-Pierre GOSSELIN

soutenue le : **19 avril 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Vectorisation de petits acides nucléiques par
des lipopolyplexes :
Application au cancer du sein**

THÈSE dirigée par :

Patrick MIDOUX
Chantal PICHON

Directeur de Recherche, INSERM, Orléans
Professeur des Universités, Orléans

RAPPORTEURS :

Elias FATTAL
Virginie ESCRIOU

Professeur des Universités, Paris-Sud
Directrice de Recherche, CNRS, Paris

JURY

Hélène BENEDETTI

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans
Présidente du jury

Elias FATTAL

Professeur des Universités, Paris-Sud

Virginie ESCRIOU

Directrice de Recherche, CNRS, Paris

Frédéric MAZURIER

Directeur de Recherche, INSERM, Tours

Magali GARY-BOBO

Chargée de Recherche, CNRS, Montpellier

Patrick MIDOUX

Directeur de Recherche, INSERM, Orléans

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Patrick Midoux et le Pr. Chantal Pichon, mes directeurs de thèse pour m'avoir donné leur confiance et pour m'avoir encadré tout au long de ce travail.

Je remercie le Dr. Eva Jakab Toth, directrice du CBM, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie également mes rapporteurs, le Pr. Elias Fattal et le Dr. Virginie Escriou pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour leurs remarques pertinentes. Je tiens également à remercier le Dr. Hélène Bénédicti, le Dr. Frédéric Mazurier et le Dr. Magali Gary-Bobo qui ont accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examinateurs.

Je remercie l'association La Ligue Nationale Contre le Cancer, pour avoir financé mon travail de thèse.

J'exprime ma reconnaissance au Dr. Patrick Baril, qui a appuyé ma candidature et qui m'a encouragée tout au long de ce travail. Je le remercie également pour ses connaissances sur les miRNA. Je remercie également le Dr. Jean-Marc Malinge pour son expertise sur les leurres moléculaires.

Un merci tout spécial pour mon « binôme »/collègue/just danseuse/amie, Chloé Leduc, qui m'a initiée au sein de l'équipe durant ma 1^{ère} semaine de stage de Master 2 et qui m'a transmis ses connaissances les plus pointues en terme de culture cellulaire, vernis à ongles et chaussures. Grâce à elle, les mots base et top-coat ont du sens pour absolument tout le monde !

Je remercie mes collègues de bureau Virginie Malard et Anthony Delalande. Virginie, toujours prête à m'écouter et à me préparer de la paella à l'improviste ! Anthony, sans qui une conversation sans jeux de mots est pratiquement impossible et avec lequel je me suis initiée au Furbish, langage très complexe sans aucune règle. Je vous laisse la grande responsabilité de la décoration du bureau je compte sur vous !

Je remercie Rudy Cléménçon, mon maître *in vivo* et le meilleur animalier de tous les temps. Merci de m'avoir guidée tout au long de ces expériences. Merci également d'avoir

été mon fournisseur officiel de volailles et aussi pour toutes nos discussions. Ton nombre de passions est beaucoup trop important pour la taille de ton garage !

Un grand merci à Marine Dubuisson dont la renommée pâtissière n'est plus à faire, Laure Magrangeas, la meilleure danseuse à 3h du matin et Anne Braconnier, qui pratique la quiche lorraine officielle, sans fromage !

J'exprime ma reconnaissance à tous les autres membres de l'équipe (et des équipes d'à côté !) passés et présents, en espérant oublier personne : Lucie, Cristine, Jean-Pierre, Geoffrey, Viorel, Lily, Aurélia, Justine, Elise et Aurore. Merci pour tous vos conseils précieux et pour l'ambiance que vous créez.

Je tiens également à remercier David Gosset et Hervé Meudal, responsables respectifs de la plateforme de cytométrie, imagerie cellulaire et de la plateforme de RMN qui m'ont permis d'appréhender ces techniques.

Je remercie également le CIPA d'Orléans, ainsi que les personnes impliquées dans mon projet, le Dr Stéphanie Lerondel, Stéphanie Rétif et Julien Sobilo.

Des remerciements pour Romain, qui a été auprès de moi durant ces dernières années et qui connaît par cœur les termes de lipopolyplexes et transfection. Merci pour ta confiance en moi et ton soutien.

Enfin, je remercie mes parents, ma belle-famille et mes amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée.

Sommaire

Remerciements.....	1
Liste des abbréviations.....	6
Introduction.....	11
Généralités.....	13
I. Le cancer	13
A. Apparition du cancer	13
B. Statistiques mondiales	14
C. Le cancer du sein	15
D. Dépistage et traitements	16
1. La chirurgie	17
2. La radiothérapie	17
3. La chimiothérapie	18
4. L'hormonothérapie	19
5. Thérapies ciblées	19
II. Les acides nucléiques comme médicaments.....	21
A. L'ADN plasmidique	22
B. Les oligonucléotides.....	24
1. Les oligonucléotides agissant sur l'ARN : les oligonucléotides antisens.....	24
2. Les oligonucléotides agissant sur l'ADN : oligonucléotides triple hélice	26
3. Les oligonucléotides agissant sur les protéines.....	26
C. Les ARNs	31
1. ARN messenger	31
2. Les réplicons.....	32
3. Les ribozymes.....	32
D. ARN interférent.....	33
1. Mécanisme de l'interférence à ARN.....	34

2. Les siRNA et miRNA comme agents thérapeutiques.....	39
III. Vectorisation des siRNA	42
A. Conjugués de siRNA.....	42
1. Conjugaison d'un siRNA à un lipide	42
2. Conjugaison d'un siRNA à un oligosaccharide.....	43
3. Conjugaison d'un siRNA à un peptide	46
B. Nanoparticules de siRNA.....	47
1. Polymères cationiques.....	47
2. Liposomes cationiques	54
3. Lipopolyplexes	64
C. Les barrières à la délivrance d'acides nucléiques.....	70
1. Les barrières extracellulaires.....	71
2. Les barrières intracellulaires	76
Projet	86
Résultats	88
I. Formulation des siRNA par les lipopolyplexes non ciblés.....	88
A. Efficacité des lipopolyplexes histidylés dans différentes lignées cellulaires	88
B. Effet des lipopolyplexes histidylés <i>in vivo</i>	93
II. Formulation des siRNA par les lipopolyplexes ciblés.....	97
A. Couplage de peptides sur les liposomes.....	97
B. Caractérisation physique des liposomes ciblés	100
1. Analyse des liposomes par RMN.....	100
2. Taille et potentiel ζ des liposomes ciblés.....	107
3. Complexation des siRNA par les liposomes ciblés	107
C. Internalisation des liposomes ciblés.....	110
1. Internalisation par les cellules 4T1	110
2. Internalisation par les cellules C2C12	118

3. Internalisation par les cellules MCEC.....	122
4. Click-chemistry	124
D. Efficacité biologique des lipopolyplexes siRNA ciblés.....	129
III. Co-délivrance de siRNA anti-STAT3 et de leurres moléculaires anti-STAT3 par les lipopolyplexes.....	132
A. Co-délivrance de siRNA anti-STAT3 et de leurres moléculaires anti-STAT3 par les lipopolyplexes <i>in vitro</i>	132
B. Effet des LPRiD-FA anti-STAT3 chez le petit animal	170
Conclusion et perspectives.....	173
Matériel et méthodes.....	179
1. Réactifs.....	179
2. Préparation des liposomes.....	180
3. siRNA et ADN plasmidique	180
4. Formation des complexes siRNA	180
5. Couplage des peptides	182
6. Couplage de ligand <i>via</i> click chemistry.....	182
7. Caractérisation des formulations	183
8. Lignées cellulaires et culture cellulaire.....	184
9. Internalisation.....	185
10. Transfection avec des siRNA.....	185
11. Mesure de l'activité luciférase	186
12. Mesure de la viabilité cellulaire	186
13. Expériences <i>in vivo</i>	186
Références bibliographiques.....	190
Annexes.....	216

Liste des abbréviations

ABC : Accelerated Blood Clearance

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGO : Argonaute

Apo-B : Apolipoprotéine-B

ARCA : Anti-Reverse Cap Analog

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

ASGPR : Asialoglycoprotein Receptor

ASO : Oligonucleotide Antisens

ATP : Adenosine Triphosphate

BCL-xL : B-Cell Lymphoma-Extra Large

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

BRCA : BReast CAncer

CD : Cytosine Desaminase

CDPim : Cyclodextrine imidazole

Chol : Cholestérol

CPP : Cell Penetrating Peptide

CRP : Protéine C-Réactive

CuAAC : copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

CX-CL12 : CXC Chemokine Ligand 12

DBCO : Dibenzocyclooctyl

DCP : Decapping enzyme

DMMAAn : Dimethylmaleic Anhydride

DOCSPER : 1,3-dioleoyloxy-2-(N-carbamoylspermyl)propane

DOPC : 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPE : 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine

DOSPER : 1,3-dioleoyloxy-2-(6-carboxyspermyl)propylamide

DOTMA : 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane

DPPC : 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine

DPPG : Dipalmitoylphosphatidylglycerol

DSAA : N,N-distearyl-N-methyl-N-2-(N'-arginyl) aminoethyl ammonium chloride

DSPC : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

dsRNA : Double stranded RNA, ARN double brin

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

Endo-siRNA : siRNA endogène

EPC : Egg Phosphatidylcholine

EPR : Enhanced Permeability and Retention

ERK : Extracellular-Signal-Regulated Kinase

FA : Folate

FANA : 2'-fluoro- β -D-arabinonucleotide

FDA : Food and Drug Administration

FR : Folate Receptor

GalNac : N-acétylgalactosamine

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

Grb2 : Growth Factor Receptor-Bound Protein 2

GTP : Guanosine Triphosphate

HDHE : L-Histidine-(N,N-di-nhexadecylamine) Ethylamide

HDL : High Density Lipoprotein

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HNSCC : Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

HpK : Polylysine Histidylée

Hsp : Heat Shock Protein

HSPG : Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine

HSV-TK : Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase

IGFR : Insulin-Like Growth Factor Receptor

IL : Interleukine

INCa : Institut National du Cancer

JAK : Janus Kinase

LDL : Low Density Lipoprotein

Lip100 : Liposomes 100

LNA : Locked Nucleic Acid

LP : Lipoplexes

LPD : Lipopolyplexes ADN/ Lipopolyplexes Decoy

LPR : Lipopolyplexes ARN

LPri : Lipopolyplexe siRNA

LPriD : Lipopolyplexes siRNA + Decoy

MART : Melanoma Antigen

MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MFI : Intensité de fluorescence moyenne

microRNA/miR : Micro Ribonucleic Acid

MLV : Moloney Murine Leukemia Virus

MMP : Matrix Metalloproteinase

mPEG-Hz-CHEMS : Methoxy Polyethylene glycol 2000-hydrazone-cholesteryl Hemisuccinate

mTOR : Mammalian Target of Rapamycin

NAG : N-Acetylglucosamine

NK : Natural Killer

PAMAM : Polyamidoamine

PBAVE : Poly(vinylether)

P-Bodies : Processing Bodies

PEI : Polyéthylèneimine

PEG : PolyEthylène Glycol

PEG-HpK : Polylysine Histidylée Pegylée

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

piRNA : Piwi-interacting RNA

PLGA : Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)

Ran-GTP : Ras-Related Nuclear Protein- GTP

RdRp : Polymérase RNA RNA-dépendante

RES : Système Réticuloendothélial

RGD : motif Arginine-Glycine-Acide Aspartique

RISC : RNA Induced Silencing Complex

RLC : RISC Loading Complex

RRM2 : Ribonucleotide Reductase Small Subunit M2

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

SELEX : Systematic Evolution Of Ligands By Exponential Enrichment

siDNA : Signal Interfering DNA

siRNA : Small/Short Interfering RNA

shRNA : Short Hairpin RNA

SNALP : Stable Nucleic Acid Lipid Particle

SPAAC : strain-promoted azido-alkyne cycloaddition

SSO : Oligonucleotide Simple Brin

ssRNA : single stranded RNA, ARN simple brin

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

TEA : Triéthanolamine

TGF- α : Transforming Growth Factor α

TLR : Toll Like Receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TRBP : TAR RNA Binding Protein

UAC : Urocanic Acid-Modified Chitosan

VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor-A

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor receptor

Introduction

Dans le cas du cancer du sein, les traitements actuels reposent sur l'utilisation de la chirurgie, la chimiothérapie, et la radiothérapie. Malgré la puissance de ces solutions, le cancer du sein reste la première cause de mortalité chez la femme de plus de 50 ans. Quelques thérapies ciblées ont vu le jour et sont notamment représentées par les anticorps monoclonaux recombinants qui vont bloquer des cibles spécifiques. Ces nouvelles thérapies sont toujours proposées en combinaison afin d'agir en synergie contre les cellules cancéreuses. Les siRNA se placent dans cette optique, en ayant pour but d'être délivrés en association avec d'autres agents anti-cancéreux.

La découverte du mécanisme de l'ARN interférence à la fin des années 1990 offre un tout nouveau potentiel de régulation des gènes. Ce phénomène induit l'extinction de l'expression de gènes par l'intermédiaire de petits ARN, microRNAs endogènes et siRNAs (small interfering RNA) exogènes. Depuis 1998, les recherches sur ces molécules n'ont cessé d'augmenter avec plus de 6000 publications sur ce sujet en 2014.

Les siRNA ont permis d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques aussi bien pour le traitement de maladies innées, comme l'asthme ou les maladies acquises comme le cancer. Ces ARN agissent au sein du complexe multiprotéique RISC (RNA-induced silencing complex) qui permet d'inhiber spécifiquement la traduction d'un ARN messager avec seulement de petites quantités d'ARN interférents. Ce mécanisme est donc hautement spécifique et permet d'agir sur des cibles bien précises. Ils permettraient ainsi d'élargir l'éventail des thérapies ciblées disponibles.

Cependant, des obstacles s'opposent à l'utilisation de ces nouvelles molécules. En effet, ces petits ARN sont fragiles et immunogènes et nécessitent par conséquent des moyens de vectorisation capables d'une part, de les transporter jusqu'aux cellules cibles et d'autre part, de les protéger des nucléases présentes dans la circulation sanguine. La vectorisation de ces siRNA demeure un challenge.

Pour réaliser cette vectorisation, de nombreux systèmes permettant la formation de nanoparticules sont en développement. Ces nanoparticules non virales doivent répondre à plusieurs critères, en particulier la capacité à traverser les barrières extracellulaires et

intracellulaires. Elles doivent être biocompatibles et non-immunogènes, être capables de délivrer les siRNA dans les cellules cibles mais surtout dans le bon compartiment cellulaire.

Malgré le nombre croissant de groupes travaillant sur les siRNA, aucun système de vectorisation pour ces molécules n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché. Néanmoins, plus d'une vingtaine sont entrées en essais cliniques pour le traitement d'une dizaine de maladies différentes.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont pour but d'exploiter une formulation appelée lipopolyplexes pour vectoriser des petits acides nucléiques (siRNA et leurre moléculaire ADN) et d'évaluer leur efficacité pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses mammaires.

Généralités

I. Le cancer

A. Apparition du cancer

La première apparition du cancer remonte à l'Antiquité, de 3000 ans à 2000 ans avant Jésus-Christ, des papyrus faisaient état de tumeurs et ulcères du sein traités par cautérisation. Il faudra ensuite attendre Hippocrate (460-370 av. J-C) pour obtenir de nouvelles informations sur le cancer. Hippocrate décrit alors des lésions touchant différentes parties du corps, et établit une classification. Il nommera cette affection *cancer*, homonyme du latin signifiant « crabe » en raison de l'apparence de celui-ci, notamment dans le cas des tumeurs du sein et des mélanomes. Les autopsies, autorisées dès le XVI^{ème} siècle, ont permis de plus grandes avancées.

Le cancer apparaît alors comme une tumeur débutant localement et s'étendant progressivement. Elle peut passer par les canaux lymphatiques et se retrouver dans d'autres organes. On appellera alors plus tard métastase ce mécanisme. Les traitements de l'époque (onguents, purges, régimes, excisions) sont cependant inadaptés face à cette maladie méconnue.

Aux XIX^{ème} et XX^{ème} siècles, de plus grandes avancées sont réalisées : l'antisepsie et l'asepsie sont utilisées durant les opérations chirurgicales pratiquées par Joseph Lister, les cultures de cellules cancéreuses *in vitro*, et l'introduction de la notion de mutations génétiques à l'origine du cancer. Les effets provoqués sur les soldats exposés au gaz moutarde inspirent en 1946 les premiers essais chimiothérapeutiques. Un dérivé de cette molécule constituant l'un des premiers agents alkylants sera utilisé en 1942 afin d'empêcher la réplication de l'ADN dans les cellules cancéreuses. À partir de cette époque, les traitements ne cesseront de se développer aussi bien que le nombre de cancer qui ne cessera d'augmenter.

B. Statistiques mondiales

En 2012, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé le cancer représente la quatrième cause de mortalité dans le monde, derrière la cardiopathie ischémique, l'accident vasculaire cérébral et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). En France, il s'agit de la première cause de mortalité avec 148 000 décès d'après Unicancer. Chez l'homme, il s'agit du cancer du poumon et chez la femme, du cancer du sein. Une liste des cancers les plus répandus est présentée en **tableau 1**.

Tableau 1. Cancer les plus répandus en France en 2012 chez l'homme et la femme.
Source INCa.

Cancers les plus répandus en France en 2012 (nouveaux cas par an)	
Homme	Femme
1. Cancer de la prostate (53 000)	1. Cancer du sein (49 000)
2. Cancer du poumon (28 000)	2. Cancer du côlon-rectum (19 000)
3. Cancer du côlon-rectum (23 000)	3. Cancer du poumon (11 000)

En France, la mortalité due aux cancers a diminué. Le dépistage permet de diagnostiquer plus tôt les cancers, diminuant la mortalité avant 65 ans. Bien que les causes du cancer soient multiples, il existe des facteurs de risques dus entre autres au mode de vie, à la consommation de tabac ou d'alcool, à l'alimentation riche mais également à l'environnement, comme l'exposition aux rayonnements ou à des pesticides.

Des virus et des bactéries sont aussi des facteurs déclencheurs du cancer comme le virus de l'Hépatite B à l'origine du cancer du foie ou la bactérie *Fusobacterium nucleatum* récemment identifiée comme étant responsable du cancer colorectal (Marchesi et al., 2011). Le facteur héréditaire représente quant à lui seulement 5% à 10% des cas pour le cancer du sein. Les gènes les plus connus sont BRCA1 et BRCA2 qui, lorsque mutés, provoquent une prédisposition génétique pour le cancer du sein et de l'ovaire avec un risque variant de 40 à 80%.

C. Le cancer du sein

Le sein est un organe contenant la glande mammaire et permettant la lactation. La glande mammaire est organisée en une vingtaine de lobes, eux-mêmes divisés en lobules. Les lobules contiennent les alvéoles qui sont la partie sécrétrice de la glande. Le lait est transporté dans les canaux galactophores qui convergent vers le mamelon. Autour de ces lobules, la glande mammaire est composée de tissus conjonctifs adipeux responsables du volume du sein (**Figure 1**). Le tissu mammaire est régulé par deux types d'hormones, les œstrogènes et la progestérone, dont les taux varient de la puberté à la ménopause. Les œstrogènes sont sécrétés par les ovaires et sont impliqués dans le fonctionnement des organes génitaux et des seins. La progestérone est quant à elle sécrétée par les ovaires à partir du quatorzième jour du cycle ovarien. Elle permet dans la puberté de développer les tissus glandulaires mammaires et, plus tard, prépare la muqueuse utérine en cas de fécondation et inhibe les contractions des muscles utérins.

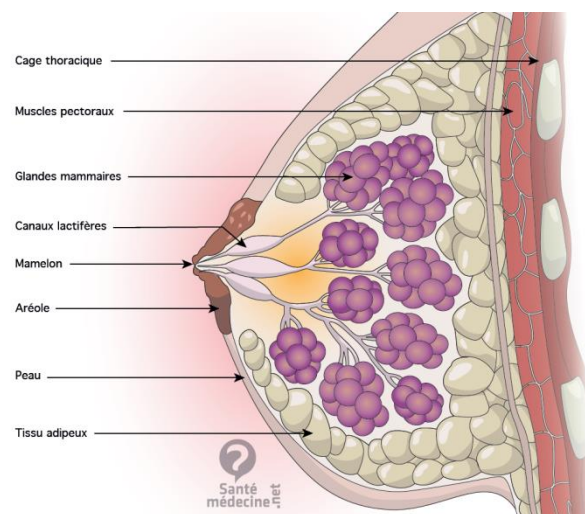


Figure 1. Anatomie du sein chez la femme.
<http://sante-medecine.commentcamarche.net/>

Il existe plusieurs types de cancers du sein qui se développent dans les différentes parties du sein. Ils sont classés en plusieurs stades suivant leur développement (**tableau 2**). Il est possible de les diviser en deux catégories : les cancers non invasifs *in situ* et les cancers invasifs infiltrants. Ceux du premier type, les plus fréquents, se développent dans les canaux mammaires et ne se propagent pas. Ils sont aisément diagnostiquables et sont généralement guérissables. Les cancers invasifs infiltrants, comme les adénocarcinomes

canalaires ou lobulaires, sont quant à eux beaucoup plus agressifs. Ils se développent dans les canaux lactifères et traversent leurs parois afin d'envahir les tissus avoisinants. A ce stade, le cancer du sein est dit métastatique (cancer de stade IV), il va atteindre les autres tissus *via* la circulation lymphatique ou sanguine. Les métastases du cancer du sein vont principalement se développer dans les poumons, le foie, les os et le cerveau.

Tableau 2. Classification des différents stades du cancer du sein

Stade	Grade du cancer	Caractéristiques
0	Tumeur de bas grade Croissance lente et risque de propagation faible	Le cancer est dit <i>in situ</i> et les cellules cancéreuses se situent soit dans un canal galactophore soit dans un lobule.
I		La taille de la tumeur ne dépasse pas 2 centimètres.
II	Tumeur de grade intermédiaire Croissance et risque modérés	La tumeur mesure entre 2 à 5 centimètres et/ou 1 à 3 ganglions lymphatiques ont été atteints.
III	Tumeur de haut grade Croissance rapide et risque de propagation élevé	Le cancer s'est propagé dans 1 à 10 ganglions lymphatiques et a envahi la peau et/ou les muscles. La tumeur va avoir tendance à se développer rapidement pour se propager.
IV		Cancer du sein métastatique Le cancer s'est répandu dans d'autres parties du corps : poumons, foie, os, cerveau.

D. Dépistage et traitements

Le dépistage du cancer du sein constitue le meilleur moyen de lutte et une prise en charge précoce améliore les chances de guérison des patientes. En France, les programmes de dépistage commencent à partir de 50 ans. Il consiste en une mammographie effectuée

tous les deux ans, suivie d'un d'examen clinique. En dessous de 50 ans, des examens cliniques des seins sont recommandés et peuvent être réalisés par les médecins généralistes et les gynécologues.

Lorsque le cancer est diagnostiqué, de nombreux traitements existent et sont adaptés à chaque cas. Ils se divisent en plusieurs catégories : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les traitements ciblés.

1. La chirurgie

Lorsque celle-ci est conservatrice (afin de conserver la plus grande partie du sein), cette opération est appelée tumorectomie, elle est souvent la première étape du traitement. La tumeur est enlevée de manière partielle ou totale. Elle est souvent accompagnée de la chirurgie des ganglions axillaires de l'aisselle (curage axillaire) ce qui permet de connaître l'état de développement du cancer et ainsi d'adapter les traitements complémentaires au mieux. La chirurgie non conservatrice consiste à enlever la totalité du sein et s'accompagne ensuite d'une reconstruction mammaire.

2. La radiothérapie

La radiothérapie suit toujours une chirurgie conservatrice afin de s'assurer de l'élimination complète des cellules cancéreuses. Elle utilise les rayonnements ionisants pour détruire localement les cellules cancéreuses. Ces rayonnements induisent des lésions importantes aux protéines, glucides, lipides et surtout des lésions à l'ADN. Ces dernières lésions ne sauront être réparées par les mécanismes de réparation des acides nucléiques. Cette thérapie s'effectue en moyenne sur 6 semaines. Elle est non douloureuse, et ne présente que peu d'effets secondaires (rougeur de la peau, œdème...).

3. La chimiothérapie

La chimiothérapie utilise des molécules chimiques qui sont délivrées de manière systémique afin de lutter contre le développement des cellules tumorales ou de provoquer leur élimination. Elle emploie différentes substances, délivrées seules ou en association. Elle est divisée en quatre grandes familles de molécules (**Tableau 3**).

Tableau 3. Mécanisme d'action des 4 classes de chimiothérapeutiques

	Action	Exemple de molécules
Agents alkylants	Ils créent des radicaux alkyles formant des liaisons covalentes avec des atomes des bases de l'ADN ou l'ARN, ce qui interfère dans les mécanismes de réplication et transcription cellulaire.	Témolozomide (Témodal™), Cyclophosphamide (Endoxan™)
Les modificateurs de l'ADN	Ils atteignent les enzymes qui maintiennent la structure de l'ADN, comme les topoisomérases.	Doxorubicine, Topotecan (Hycamtin™)
Antimétabolites	Ils interviennent durant la phase S du cycle cellulaire, se substituent aux nucléotides en prenant la place des purines et pyrimidines, ce qui empêche la division cellulaire.	5-fluorouracile, Fludarabine (Fludara™)
Les poisons de fuseau	Ils agissent lors de la mitose, et inhibent la migration des chromosomes le long des fuseaux cellulaires avant que les cellules ne se séparent.	Vincristine (Oncovin™), Paclitaxel (Taxol™)

4. L'hormonothérapie

Certaines tumeurs mammaires ont la particularité d'être hormonosensibles, ce qui signifie que leur croissance va être stimulée par les hormones telles que les œstrogènes ou encore la progestérone. Pour ce faire, les cellules cancéreuses surexpriment des récepteurs à ces hormones qui une fois captées, déclenchent des voies de signalisation menant à la prolifération cellulaire. Des molécules ont donc été conçues afin d'enrayer l'action de ces hormones. Concernant les molécules bloquant l'action des œstrogènes, il existe le tamoxifène (Nolvadex®) et le fulvestrant (Faslodex®). Concernant les molécules inhibant les aromatasés, il existe l'anastrozole (Arimidex®) et le létrozole (Femara®).

5. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont des thérapies innovantes développées durant les quinze dernières années dans le but d'agir sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses. Ces thérapies sont adaptées au cas par cas pour les patientes et permettent d'obtenir en théorie une meilleure efficacité du traitement tout en réduisant les effets secondaires. Ces thérapies peuvent être utilisées en combinaison avec la chimiothérapie afin de maximiser les effets du traitement.

Le récepteur HER2

La thérapie ciblée est particulièrement utilisée pour traiter les cancers du sein HER2 positifs, soit 25% des cas. Ces cancers sont très agressifs et sont associés à un pronostic défavorable. Le récepteur HER2/neu est un récepteur au facteur de croissance EGF. Il fait partie de la famille des récepteurs EGFR composée de quatre récepteurs présentant des homologies importantes : EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4. Ces récepteurs sont des glycoprotéines possédant trois domaines, un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire avec une activité tyrosine kinase (sauf pour HER3).

Dans la cellule normale, HER2 a un rôle dans la croissance cellulaire et la différenciation (Rubin and Yarden, 2001). Sous forme monomérique ce récepteur est

inactif et il doit se dimériser pour effectuer une signalisation. Il peut soit former un homodimère, soit un hétérodimère avec EGFR, HER3 et HER4. L'homodimère HER2 possède la particularité de ne pas avoir de ligand spécifique connu (Yarden, 2001). Cependant, il peut être activé grâce aux ligands d'EGFR, de HER3 et de HER4 lorsqu'ils forment des hétérodimères avec HER2, comme l'EGF, le TGF- α , ou l'amphiréguline (Zaczek et al., 2005). Après fixation du ligand, le récepteur se dimérise et les résidus tyrosine du domaine intracellulaire sont phosphorylés déclenchant ensuite différentes voies de signalisation : la voie JAK/STAT, la voie Raf/MEK/ERK et la voie PI3K/AKT (**figure 2**). Ces voies de signalisation vont aboutir à des signaux de prolifération cellulaire, de survie, d'angiogenèse, de migration, d'adhésion et d'invasion (Yarden, 2001).

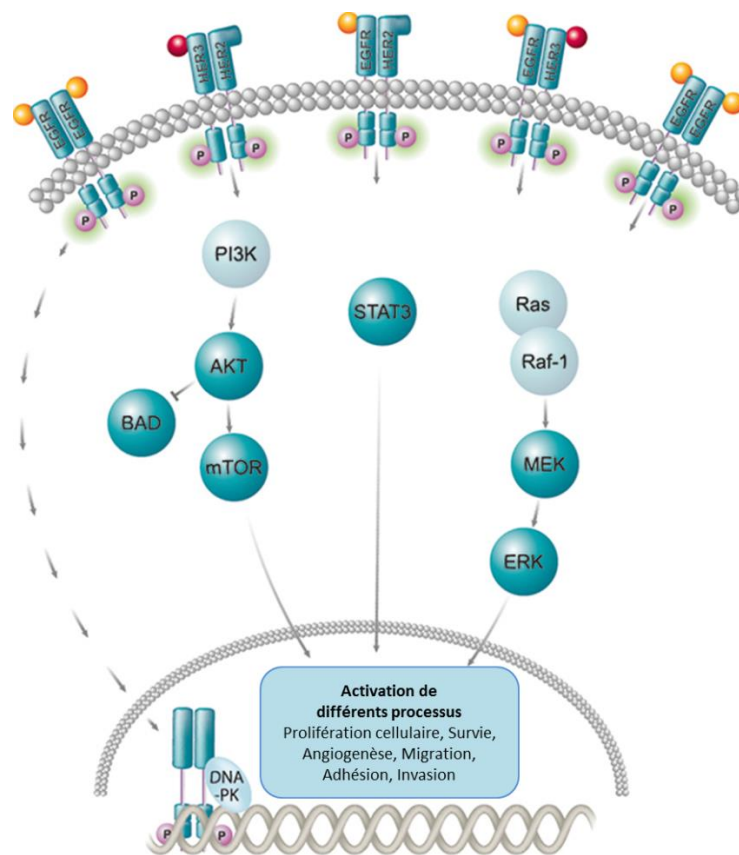


Figure 2. Voies de signalisation activées par l'activation d'HER2 (cisbio.com).

Lors des cancers HER2 positifs, les cellules vont surexprimer ce récepteur en raison d'une amplification de la transcription. Ce récepteur peut être aussi constitutivement activé à cause d'une substitution d'une valine par un acide glutamique dans le domaine transmembranaire (Penuel et al., 2002). Les thérapies ciblées visent à bloquer les signaux

cellulaires déclenchés par la surexpression de ce récepteur HER2. La première molécule développée fut le Trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal bloquant la partie extracellulaire du récepteur HER2, commercialisé par Genentech (Recondo et al., 2014). Dans des essais cliniques, il a été utilisé seul (Baselga, 2001) ou en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques (Gelmon et al., 2015; Swain et al., 2015), ce qui a permis d'augmenter la survie des patientes.

D'autres traitements ciblés ont été développés pour agir contre des protéines impliquées dans le cancer du sein, quelques exemples sont présentés dans le **tableau 4**.

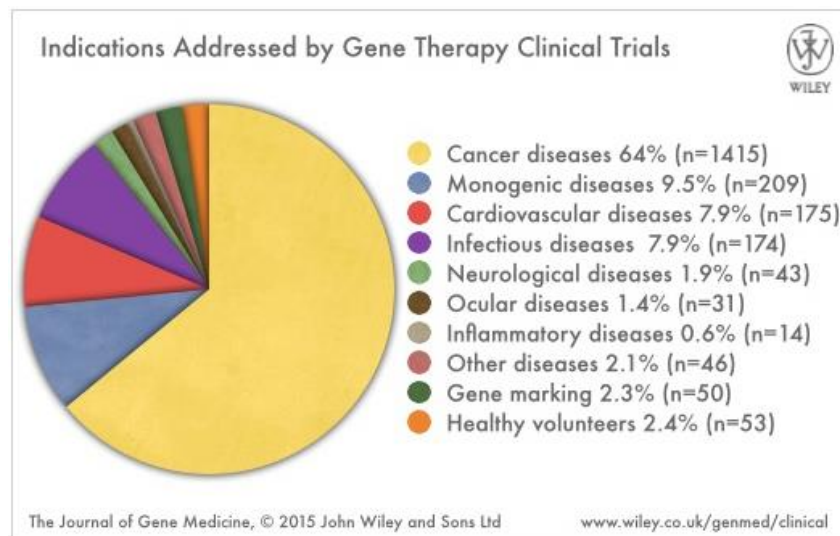
Tableau 4 : Liste non exhaustive de molécules utilisées en thérapie ciblée.
Adapté de (Normanno et al., 2009).

Cible	Molécule	Nom commercial	Industrie pharmaceutique
HER2	Trastuzumab	Herceptin ®	Genentech/Roche
	Pertuzumab	Perjeta ®	Genentech/Roche
EGFR	Lapatinib	Tyverb ®	GSK
VEGF-A	Bevacizumab	Avastin ®	Genentech/Roche
VEGFR	Sorafenib	Nexavar ®	Bayer Healthcare /Onyx Pharmaceuticals Pfizer
	Axitinib	Inlyta ®	
mTOR	Everolimus	Afinitor ®	Novartis

II. Les acides nucléiques comme médicaments

Avec l'amélioration des connaissances des mécanismes moléculaires cellulaires, trois approches de thérapies géniques ont été développées : l'introduction d'un gène fonctionnel pour (a) remplacer un gène muté non fonctionnel, (b) produire une protéine ou un acide nucléique thérapeutique et (c) moduler ou supprimer l'expression d'un gène (Fischer, 2014). A l'origine, la thérapie génique avait pour but de traiter les maladies génétiques mais actuellement elle concerne aussi bien les maladies génétiques que les

maladies acquises comme le cancer qui représente la majeure partie des essais cliniques (Figure 3).



**Figure 3. Essais cliniques en thérapie génique dans le monde.
(D'après The Journal of Gene Medicine, 2015)**

On peut différencier la thérapie génique qui consiste à délivrer un ADN plasmidique codant un ADNc des autres approches utilisant d'autres types d'acides nucléiques : ARNm, oligonucléotides, ribozymes et ARN interférents. Pour ces derniers, on parlera de thérapie génique si l'ADNc code pour un oligonucléotide, un ribozyme ou un ARN interférent. La délivrance d'ADN plasmidique présente des difficultés principalement dans son importation nucléaire dans des cellules quiescentes. C'est pour cette raison que la délivrance de petits acides nucléiques de synthèse tels les microARNs (miRNA), les petits ARN interférents (siRNA), et les leurres ADN qui agissent dans le cytoplasme suscitent de plus en plus d'intérêt.

A. L'ADN plasmidique

La délivrance d'un gène est réalisée avec un ADN plasmidique contenant l'ADNc du gène. Pour le traitement du cancer, il peut coder pour une protéine avec une activité thérapeutique, immunomodulatrice ou toxique. Le gène codant la protéine P53 est souvent utilisé, puisque ce gène suppresseur de tumeur, est muté dans 50% des cancers humains.

La restauration de la protéine fonctionnelle après transfection du gène p53 permet de réinitier une activité apoptotique dans les cellules cancéreuses. La délivrance de plasmide codant pour p53 dans un modèle de cancer ovarien chez la souris a permis de réduire les volumes tumoraux de 60% (Kim et al., 2003a). Dans des essais cliniques, le plasmide codant pour p53 a été utilisé pour le traitement de tumeurs solides. Les résultats de phase I montrent que le plasmide vectorisé dans un liposome cationique s'accumule préférentiellement dans les tissus tumoraux, et l'augmentation de la protéine est détectée dans les biopsies de patients traités. Une phase clinique Ib a été initiée pour tester la délivrance de p53 en combinaison avec le docetaxel, un agent chimiothérapeutique (Senzler et al., 2013).

Les gènes codant des protéines immunomodulatrices permettent d'induire une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Par exemple, sont utilisés des plasmides codant des cytokines, comme l'interleukine-12 ou le TNF- α . En agissant au sein de la tumeur, le TNF- α a des effets toxiques et peut activer les cellules immunitaires. Dans le traitement du fibrosarcome, la délivrance de plasmide codant pour le TNF- α a permis la régression totale des tumeurs chez 63% des animaux traités (Kircheis et al., 2002). En clinique, un vecteur adénoviral, non répliquatif, codant le gène p53 est entré en phase III (NCT00041613) pour le traitement du cancer de la tête et du cou.

L'approche dite « gène suicide » consiste en l'introduction dans les cellules cancéreuses, d'un gène codant une protéine qui va permettre la conversion d'une molécule non toxique en un composé toxique pour la cellule. Le plus connu est le gène codant la protéine HSV-TK (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase), non présente dans les cellules humaines, qui transforme le ganciclovir (non toxique) en ganciclovir triphosphate, un analogue de nucléotide (Fillat et al., 2003). Ceci a deux effets, d'une part il y a inhibition de l'ADN polymérase et d'autre part, l'incorporation de cet analogue dans l'ADN induit la terminaison de l'élongation de l'ADN lors de la réplication et la mort cellulaire (Wang et al., 2004). Des essais cliniques utilisant ce système ont été réalisés pour le traitement des glioblastomes (Voges et al., 2003) et le cancer de la prostate (Shirakawa et al., 2007). Un autre gène suicide a été également utilisé : le système CD (Cytosine Désaminase) métabolisant le 5-Fluorocytosine en 5-Fluorouracile (Altanerova et al., 2012).

B. Les oligonucléotides

1. Les oligonucléotides agissant sur l'ARN : les oligonucléotides antisens

Les oligonucléotides à visée thérapeutique sont apparus en 1978, lorsque Zamecnik et Stephenson ont découvert qu'un oligodésoxyribonucléotide simple brin de 13 bases, complémentaire à une séquence d'ARN du virus du sarcome de Rous était capable d'inhiber la réplication du virus *in vitro* (Stephenson and Zamecnik, 1978; Zamecnik and Stephenson, 1978). Ce fut le début des oligonucléotides antisens.

Les oligonucléotides antisens (ASO) sont des séquences de 18 à 21 nucléotides qui sont capables de s'hybrider à une séquence d'ARNm. Cette chimère ASO-ARN est par la suite dégradée par la RNase H. Le premier ASO utilisé en essai clinique est le G3139 (Oblimersen), développé par Genasense en 1997. Il est composé de 18 nucléotides ciblant les six premiers codons de la séquence initiatrice dans le transcrit du gène Bcl2. Il a été utilisé dans le traitement du lymphome non-Hodgkinien en essai clinique de phase I/II et a fourni des résultats encourageants (Waters et al., 2000; Webb et al., 1997). En phase III, dans la leucémie lymphoïde chronique, cet ASO utilisé en combinaison avec le fludarabine/cyclophosphamide, permet d'augmenter la réponse au traitement (O'Brien et al., 2007). Ce même ASO a été également utilisé dans le traitement du cancer de la prostate et du myélome (Chanan-Khan, 2005; Chi et al., 2001). Cependant, en 2010, le G3139 n'a pas reçu l'accord de la FDA en raison de résultats décevants pour le traitement de mélanome.

Néanmoins, un ASO a obtenu l'accord de la FDA en 1998, il s'agit du Fomivirsén (Vitravene) commercialisé par Isis Pharmaceuticals, un antisens qui traite la rétinite à cytomegalovirus chez les patients atteints du SIDA et qui est délivré par injection intraoculaire. Récemment un deuxième ASO vient d'être mis sur le marché, le Mipomersén (Kynamro), commercialisé par Genzyme. Il est utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale en ciblant le transcrit de l'apolipoprotéine B100. Le **tableau 5** présente les ASO qui sont en essais cliniques pour le traitement du cancer.

Tableau 5. Liste non exhaustive d'essais cliniques utilisant des ASO pour le traitement du cancer.

Phase d'étude	Oligonucléotide	ARNm cible	Cancer	Identifiant Clinicaltrials.gov
Phase II	AZD9150	STAT3	Cancer ovarien/gastrointestinal	NCT02417753
Phase II	OGX-427	Hsp27	Carcinome de la vessie	NCT01780545
Phase I	IGF-1R/AS ODN	IGF-1R	Gliome	NCT02507583
Phase I	BP1001	Grb2	Leucémie	NCT01159028
Phase I	AZD5312	Récepteur aux androgènes	Tumeurs solides	NCT02144051

Des oligoribonucléotides antisens sont utilisés dans le cadre de la stratégie saut d'exon. On parle alors de splice switching oligonucleotides (SSO). Cette stratégie qui a été très développée pour le traitement de la myopathie musculaire de Duchenne, consiste à agir sur l'épissage de l'ARNm de la dystrophine en permettant de « sauter » un exon muté et d'obtenir une dystrophine légèrement modifiée mais fonctionnelle (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Tanganyika-de Winter et al., 2012; Wu et al., 2011). Ainsi, les SSO permettent de pallier un mauvais épissage, ou l'altérer volontairement.

Dans le cas du cancer du sein HER2 positif, cette stratégie est à ses débuts et a pour but de provoquer un mauvais épissage de l'ARNm de HER2 pour le rendre non fonctionnel. Le SSO111 est un oligonucleotide de 20 bases qui va se lier au site d'épissage de l'exon 15 (**figure 4**) (Wan et al., 2009). L'exon 15 est excisé, produisant un ARNm plus court. La protéine produite $\Delta 15$ HER2, n'est plus capable de s'ancrer à la membrane ce qui induit l'inhibition de la croissance cellulaire *in vitro* sur les cellules SK-BR-3.

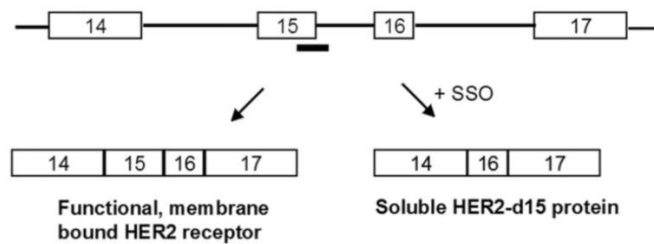


Figure 4. Illustration du saut d'exon de l'ARNm de HER2 (Wan et al., 2009).

2. Les oligonucléotides agissant sur l'ADN : oligonucléotides triple hélice

Certains oligodésoxyribonucléotides sont capables de former des structures en triple hélice après hybridation avec une région riche en purine/pyrimidine dans le sillon majeur de l'ADN. Ceci forme un appariement de type Hoogsteen avec des liaisons hydrogènes établies avec des purines du duplex (Liu et al., 2002a). La première inhibition de la transcription *via* ce système a été obtenue en 1988 sur le gène c-myc (Cooney et al., 1988). Depuis, d'autres oligonucléotides formant des triples hélices ont été utilisés pour le traitement du cancer, comme par exemple contre le gène igf-1 dans le cas du gliome (Ly et al., 2001; Trojan et al., 2003). Cependant, cette approche reste peu utilisée puisque les séquences naturelles capables de former des triples hélices sont assez rares dans le génome, avec une occurrence tous les 250 nucléotides, ce qui reste faible pour pouvoir cibler la plupart des promoteurs (Wickstrom, 1998).

3. Les oligonucléotides agissant sur les protéines

Les aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides simple brin d'une longueur de 12 à 30 nucléotides, ADN ou ARN, capable d'interagir avec les protéines en reconnaissant une structure tridimensionnelle donnée, à la manière des anticorps. Ils peuvent agir de différentes manières, d'une part, ils peuvent servir de ciblage en reconnaissant des biomarqueurs exprimés à la surface des cellules cancéreuses, il faut alors les conjuguer avec une autre molécule thérapeutique. D'autre part, ils peuvent se lier aux protéines et les empêcher d'exercer leur fonction cellulaire.

Ces aptamères sont produits par l'approche SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), une méthode basée sur une amplification répétitive et un processus d'enrichissement (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). En premier lieu, une librairie d'oligonucléotides est formée de 10^{14} - 10^{15} séquences d'ADN simple brin aléatoires dont les séquences aux extrémités 5' et 3' ne sont pas variables. Ces oligonucléotides sont incubés avec la protéine cible, qui vont retenir certaines séquences avec une affinité importante (10^{-8} - 10^{-9} M). Après une étape de lavage, les oligonucléotides sont amplifiés et sont réutilisés pour un autre cycle de liaison à la protéine afin de ne retenir que les séquences possédant la plus haute affinité pour la cible.

L'aptamère AS1411 est actuellement la molécule la plus avancée dans le traitement du cancer. Cet aptamère, développé par Aptamera, est un oligonucleotide ADN de 26 nucléotides riche en résidus guanosine capable de former une structure en quadruplexe (Abdelmohsen and Gorospe, 2012). Il a comme cible la nucléoline, une protéine impliquée dans la synthèse et la maturation des ribosomes, surexprimée dans plusieurs cancers tels les gliomes, la leucémie, le cancer du sein et du foie (Berger et al., 2015). L'AS1411 peut se lier à la nucléoline exprimée à la membrane. L'AS1411 est ensuite internalisé et empêche la nucléoline d'exercer son rôle, par conséquent, la synthèse d'ADN est inhibée (Xu et al., 2001). Les essais cliniques de phase II pour le traitement de la leucémie myéloïde sont actuellement terminés (Mongelard and Bouvet, 2010). Les résultats des essais cliniques pour le traitement du carcinome métastatique rénal sont plus mitigés avec un seul patient qui a répondu au traitement (Rosenberg et al., 2014). Un autre aptamère est en essai clinique de phase II pour le traitement de la leucémie, du myélome et du glioblastome, le NOX-A12 dirigé contre le CXCL12 (Stromal Cell-Derived Factor 1), une chimiokine impliquée dans la croissance cellulaire et l'angiogenèse (Hoellenriegel et al., 2014). Il est délivré en association à des agents chimiothérapeutiques (rituximab/bendamustine ou bortezomib/ dexamethasone) afin d'optimiser les effets thérapeutiques.

Les leurres moléculaires ADN

Contrairement aux aptamères, les leurres moléculaires ADN ne reconnaissent pas des structures 3D spécifiques mais possèdent des séquences se liant aux facteurs de transcription. Ils se comportent ainsi comme des leurres, puisque le facteur de

transcription est piégé, et ne pourra plus se fixer sur les séquences promotrices des gènes impliqués dans le cancer par exemple (**figure 5**). Cette stratégie fut d'abord exploitée en 1990 en tant que système d'étude de l'activité des facteurs de transcription dans la différenciation cellulaire (Bielinska et al., 1990). Ces leurres moléculaires sont le plus souvent des courtes séquences d'ADN double brin avec des groupements phosphorothioate ce qui permet d'améliorer leur stabilité dans les fluides biologiques (Marshall and Caruthers, 1993).

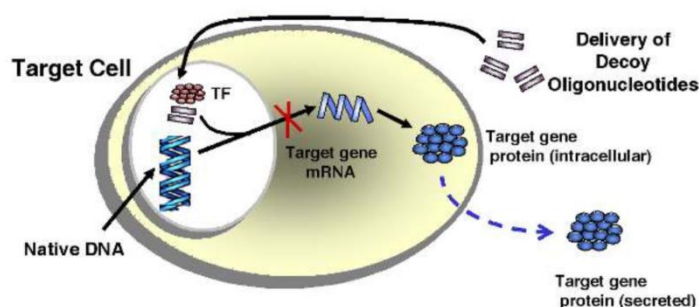


Figure 5. Inhibition de l'action d'un facteur de transcription par la stratégie du leurre moléculaire (Mann, 2005).

L'équipe de V. Dzau en 1995 a conçu un leurre moléculaire ADN ciblant la famille du facteur de transcription E2F pour le traitement de l'hyperplasie vasculaire (Morishita et al., 1995). Les facteurs de transcription E2F ont divers rôles dans le cycle cellulaire et la prolifération. Parmi cette famille, E2F1 est impliqué dans la régulation de gènes tels que c-myc, la cycline cdc2, et pcna impliqués dans la synthèse d'ADN et la mitose. La délivrance *in vivo* d'un leurre moléculaire contre E2F1, dans un modèle d'hyperplasie vasculaire, permet l'inhibition de la prolifération cellulaire.

Depuis cette preuve de concept, cette stratégie s'est développée et plusieurs types de leurres moléculaires ont émergé. Une fois la séquence consensus connue, il est relativement rapide de synthétiser différents oligonucléotides pour servir de leurre. Les leurres peuvent être classiques, avec un squelette phosphodiester ou modifiés avec un squelette phosphorothioate. Ils peuvent également former une tige boucle ou avoir une structure dumbbell (en haltère) (Lesage et al., 2003; Tomita et al., 2003). Ces derniers sont beaucoup plus résistants aux nucléases et moins immunogènes.

Les siDNA (signal interfering DNA), parmi lesquels les Dbait, sont des petites molécules d'ADN mimant des cassures double brin. Cette molécule développée par DNA Therapeutics, est utilisée afin de leurrer les systèmes de réparation de l'ADN et est utilisée avant la radiothérapie (Quanz et al., 2009). Ainsi, dans les cellules cancéreuses, les Dbait vont piéger les protéines impliquées dans les systèmes de réparation provoquant l'apoptose. Dans le cas du mélanome, le Dbait DT01, a été administré avant la radiothérapie dans un essai clinique de phase I (NCT01469455). Les résultats ont montré une bonne tolérance de la molécule ainsi qu'une réponse au traitement.

Dans le cancer, la stratégie du leurre moléculaire est utilisée afin de leurrer la protéine STAT3, un facteur de transcription retrouvé constitutivement activé dans beaucoup de cancers (le myélome multiple, le lymphome, le cancer du sein, des ovaires, des poumons...). STAT3 entre dans la régulation de gènes impliqués dans la prolifération, l'invasion et l'inhibition de l'apoptose tels que la cycline D1, les métalloprotéases (mmp2, mmp9), twist, Bcl-xL, et la survivine (Yu et al., 2007). La famille STAT est composée de sept membres (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6), possédant la même séquence consensus TT(N4-6)AA. Sous forme activée, STAT3 est phosphorylé ce qui provoque sa dimérisation et son passage dans le noyau. Il se fixe ensuite sur ses séquences promotrices et active ses gènes cibles. STAT3 est activé par exemple *via* des kinases associées à des récepteurs, à des facteurs de croissance et des cytokines (**figure 6**).

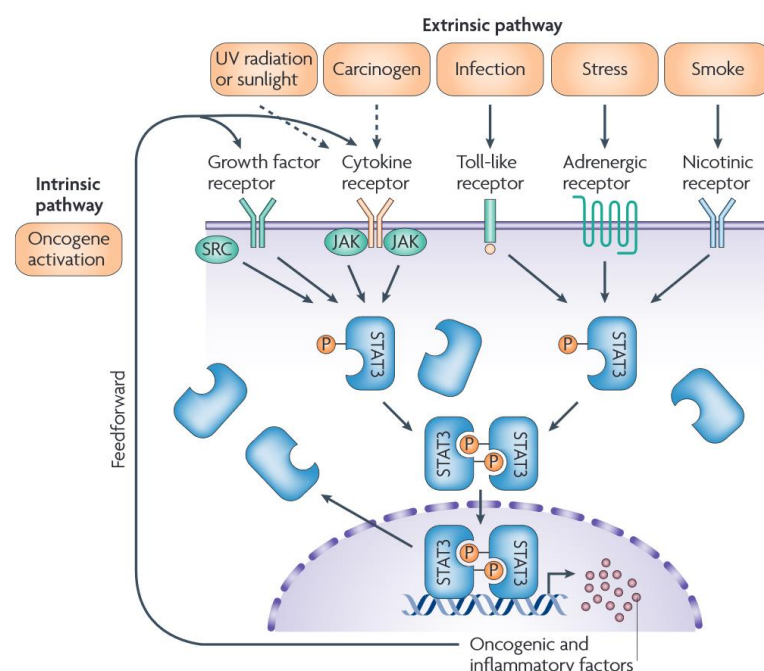


Figure 6. Voies d'activation du facteur de transcription STAT3.

De par ses nombreux rôles, STAT3 est une cible intéressante en thérapie anticancéreuse. En la ciblant, plusieurs processus cancéreux se retrouvent ainsi impactés. Plusieurs équipes ont travaillé sur la conception de leurres moléculaires ciblant STAT3.

Leong *et al.*, ont utilisé cette approche dans le cas du cancer de la tête et du cou, avec la séquence 5'-CATTTCCCGTAAATC-3', 3'GTAAAGGGCATTAC-5' (Leong et al., 2003). Ils ont montré la diminution de la protéine Bcl-xL ainsi que la diminution de la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro*. La même équipe a démontré plus tard l'efficacité de ce leurre *in vivo* (Xi et al., 2005). Pour cela, des souris portant des tumeurs induites par les cellules HNSCC (cellules humaines cancéreuses du pharynx) greffées en sous-cutané ont reçu en injection intratumorale 25 µg de leurre STAT3 seul ou en combinaison avec le cisplatine (5mg/kg). Les résultats montrent que le leurre STAT3 + cisplatine permettent la diminution du volume tumoral. En combinaison, le leurre STAT3 + cisplastine permet d'obtenir de meilleurs résultats que la délivrance de ces molécules séparément. Ceci démontre l'intérêt d'utiliser une thérapie combinée.

En utilisant la même séquence que précédemment d'autres groupes ont obtenu une diminution de la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires A549 *in vitro* ainsi que la baisse significative du volume tumoral après injection intratumorale de 25 µg de leurre Stat3 seul (Zhang et al., 2007).

Ce même leurre a été utilisé dans le cancer ovarien (Zhang et al., 2010), et d'autres séquences ont servi pour le traitement de l'adénocarcinome du colon et du cancer du sein (Souissi et al., 2011). Le leurre moléculaire stat3 est entré en essai clinique de phase 0 en 2012 (NCT00696176), un essai préliminaire permettant d'évaluer l'effet de la molécule sur un petit nombre de personnes malades et de calculer la dose sans effet toxique (Sen et al., 2012). L'oligonucléotide utilisé contient des groupements phosphorothioates afin d'améliorer sa stabilité. Des doses de 250 µg à 1 mg ont été injectées aux patients en injection intratumorale et aucun effet toxique n'a été observé. Après résection de la tumeur, une diminution des gènes de la cycline D1 et Bcl-xL a été démontrée. En délivrance intraveineuse, à une dose de 5mg/kg, aucun effet toxique et thérapeutique n'a été noté ce qui laisse penser que la délivrance locale est préférable. Ces résultats encourageants vont permettre le développement de ce leurre pour d'autres essais cliniques.

C. Les ARNs

1. ARN messenger

La délivrance d'ARNm synthétique permet de contourner les difficultés liées à la délivrance d'ADN puisqu'il n'est pas nécessaire d'introduire l'ARNm dans le noyau cellulaire pour obtenir la protéine et qu'il n'y a pas d'insertion dans le génome et donc pas de risque de mutation insertionnelle. Les ARNm synthétiques sont produits par transcription *in vitro*. Ils possèdent une coiffe ARCA (anti-reverse cap analogue) à leur extrémité 5' (**figure 7**). Cette coiffe modifiée ne peut s'incorporer que dans le bon sens et améliore l'efficacité de transfection (Mockey et al., 2006; Stepinski et al., 2001). Les transcrits possèdent également une queue polyA d'environ 100 résidus adénosine à leur extrémité 3', qui permet aussi une bonne efficacité de transfection des cellules (Mockey et al., 2006).

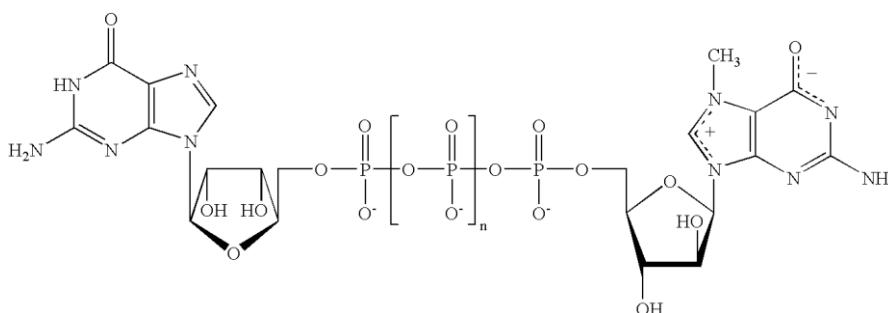


Figure 7. Structure de la coiffe ARCA (Stepinski et al., 2001)

Le transfert d'ARNm est surtout utilisé dans le cadre de la vaccination anti-tumorale. Le principe est de stimuler le système immunitaire contre un antigène tumoral pouvant après transfert de l'ARNm créer une forte réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Un vaccin anti-tumoral doit être capable d'activer des réponses immunes innées et adaptatives ainsi que les cellules T mémoires pour que la vaccination soit efficace sur le temps. Plusieurs essais cliniques ont été et sont en cours pour le cancer (**tableau 6**). Dans ces essais, Les ARNm synthétiques sont injectés par voie intradermique chez les patients. Les résultats de ces essais montrent pour l'instant, l'induction d'une réponse immune spécifique contre les cellules tumorales chez les patients.

Tableau 6. Essais cliniques utilisant la délivrance d'ARNm pour la vaccination anti-tumorale.

Phase d'étude	Antigène	Cancer	Identifiant Clinicaltrials.gov
Phase I/II	MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, survivine, 5T4	Cancer des poumons	NCT00923312
Phase I/II	PSA, PSCA, PSMA, STEAP1	Cancer de la prostate	NCT01817738
Phase I/II	Melan-A, Tyrosinase, gp100, MAGE-A1, MAGE-A3, Survivine	Mélanome métastatique	NCT00672542

MAGE-C1/C2/A3 : Antigène du mélanome NY-ESO-1 : antigène tumoral (New York – Esophageal Cancer), 5T4 : Trophoblast glycoprotein/antigène de carcinome, PSA : Antigène spécifique de la prostate, PSCA : Antigène de cellules souches de prostate, PSMA : Antigène membranaire spécifique de la prostate, STEAP1 : Metalloreductase 1, Melan-A : Antigène du mélanome, gp100 : Glycoprotein 100/antigène du mélanome.

2. Les réplicons

Les vaccins à base de réplicons sont en développement (Rodríguez-Gascón et al., 2014). Il s'agit de molécules d'ARN d'une longueur d'environ 10kb, conçues à partir du génome de certains virus tels que l'alphavirus (Atkins et al., 2008). Ces réplicons codent pour des facteurs permettant l'amplification de l'ARNm d'intérêt dans la cellule transfectée et donc permettent une production *in situ* d'un plus grand nombre de molécules à partir d'un réplicon transfecté (Geall et al., 2013). Les vaccins à base de réplicons seraient donc plus efficaces que ceux à base d'ARNm.

3. Les ribozymes

Les ribozymes sont des petits ARN dotés d'une activité catalytique. Ils peuvent s'hybrider avec un ARNm et le cliver. Ils ont été découverts au début des années 1980 par

Thomas R. Cech et Sidney Altman ce qui leur a valu le prix Nobel de Chimie en 1989. Ils sont utilisés par exemple pour couper les transcrits des oncogènes. Le ribozyme Angiozyme™ cible l'ARNm du récepteur au VEGF afin d'inhiber l'angiogenèse. Dans un essai clinique de phase I, il a été bien toléré, cependant lors de l'essai clinique de phase II, il n'a pas démontré d'efficacité significative chez les patients atteints de cancer du sein métastatique (Morrow et al., 2012).

D. ARN interférent

L'interférence à ARN est un phénomène qui fut découvert au début des années 1990 et a joué un rôle déterminant dans la vision de la régulation des gènes. Cette découverte fut d'abord faite chez les végétaux, par des chercheurs voulant rendre des pétunias plus colorés. A cette fin, l'équipe de R. Jorgensen décide de surexprimer une enzyme, la chalcone synthase, impliquée dans la biosynthèse des pigments chez le pétunia (Napoli et al., 1990). Cependant, les résultats obtenus furent contraire à ceux attendus. Les pétunias sont devenus partiellement blancs, voire totalement du fait de l'extinction de l'expression du gène endogène de la chalcone synthase. Ils ont alors appelé ce phénomène : co-suppression ou PTGS (post-transcriptional gene silencing) qui est retrouvé chez plusieurs plantes. Plus tard, ce phénomène fut attribué à la surexpression du gène de la chalcone synthase qui aurait produit des transcrits aberrants. Ces mêmes transcrits se seraient appariés avec les transcrits endogènes menant au clivage des ARNm (Metzlaff et al., 1997).

Plus tard, ce mécanisme d'interférence a été élargi aux cellules animales. En 1998, Craig Mello et Andrew Fire injectent des doubles brins d'ARN dans le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Ils ont remarqué que ceux-ci entraînaient l'extinction de gènes et que celle-ci est plus efficace lorsque l'ARN délivré est sous forme de double brin. De plus, ce processus requiert très peu de molécule d'ARN et s'avère très spécifique. Ce travail leur vaudra le prix Nobel de médecine en 2006. Plus tard, les mécanismes de l'ARN interférence sont mis à jour avec la découverte des différents acteurs : des ARN de 20 à 30 nucléotides, la protéine Dicer et le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) (Bernstein et al., 2001; Elbashir et al., 2001a; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000).

1. Mécanisme de l'interférence à ARN

Tout d'abord, l'interférence à ARN fait intervenir des petits ARN qui peuvent se diviser en trois catégories : les miRNA (microRNA), les siRNA (short interfering RNA) et les piRNA (piwi interacting RNA). Ces derniers restent encore méconnus, ils agissent dans la répression des transposons et utilisent une voie différente de celles des miRNA et siRNA (Watanabe and Lin, 2014).

a) Les miRNA

D'après la base de données miRBase, environ 2000 miRNA ont été identifiés chez l'homme (Griffiths-Jones et al., 2008). Ces miRNA sont des petits ARN simple brin originaires de loci dans le génome eucaryote. Ils prennent naissance dans le noyau où ils sont transcrits par la polymérase II en précurseurs (pri-miRNA) d'une longueur d'au moins 1000 nucléotides qui forment des structures secondaires comprenant une à plusieurs tiges boucles (Saini et al., 2007) (**figure 8**). Ces pri-miRNA sont ensuite découpés par l'enzyme DROSHA et la protéine DGCR8 en pre-miRNA d'une taille de 60 à 80 nucléotides qui peuvent être exportés hors du noyau par l'Exportin-5 et Ran-GTP (Lund and Dahlberg, 2006). Enfin, pour obtenir un miRNA mature de 22 nucléotides, le pre-miRNA est traité par DICER1. A ce stade le pre-miRNA est un double brin avec un brin passager (brin sens) et un brin guide (antisens). Après séparation, le brin guide est intégré dans le complexe RISC pour exercer son activité sur l'ARNm du gène d'intérêt. La séquence de reconnaissance de l'ARNm codée dans le miRNA est appelée « seed region » et est constituée de 7 nucléotides à partir de l'extrémité 5'. L'appariement entre l'ARNm et le miRNA n'est donc pas total, mais il est impératif que la séquence de la seed region et la séquence cible de l'ARNm soit totalement appariée pour qu'il y ait clivage de cet ARNm (**figure 9**) (Lai, 2002).

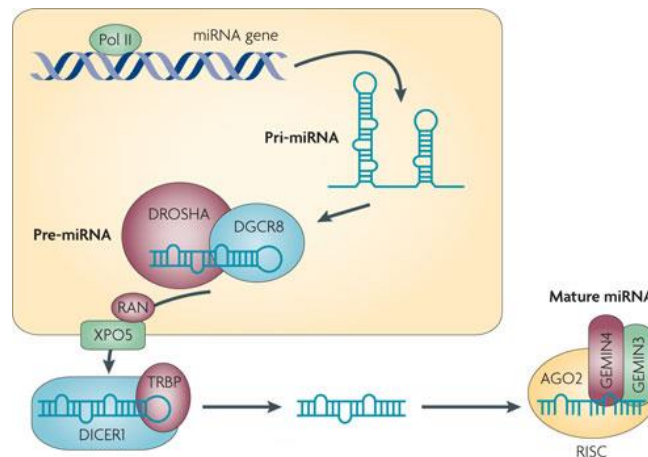


Figure 8. Biogénèse des miRNA dans le noyau et maturation (Ryan et al., 2010)

Il est admis désormais que les miRNA jouent un rôle global dans la régulation de nombreux gènes : environ 60% du transcriptome serait sous dépendance des miRNA selon des études bioinformatiques (Friedman et al., 2009). Ils interviennent dans des processus de prolifération cellulaire, de différenciation cellulaire ou encore d'apoptose (Cheng et al., 2005). Leur dérégulation, aussi bien leur surexpression que leur sous-expression est associée à des phénomènes pathologiques tels que les cancers. Il est possible alors de définir des profils d'expression de miRNA dans des conditions normales et pathologiques.

Dans le cancer, les miRNA peuvent intervenir à plusieurs niveaux en jouant un rôle de suppresseur de tumeur ou au contraire d'oncogène. Ils vont ainsi être une cible thérapeutique afin de rétablir une expression correcte de miRNA ou un biomarqueur pour une pathologie donnée. Par exemple, dans le cancer du sein, une étude sur 14 lignées de cellules humaines du cancer du sein a permis de mettre en évidence des miRNA surexprimés (miR-10b) ou sous-exprimés (miR-145). Le miR-10b joue un rôle dans la régulation négative de la transition EMT des cellules Epithéliales vers les cellules Mésoenchymateuses, une étape clé dans l'invasion des cellules cancéreuses (Ma et al., 2010). Le miR-145 quant à lui est considéré comme un suppresseur de tumeur en régulant l'oncogène c-myc (Sachdeva et al., 2009).

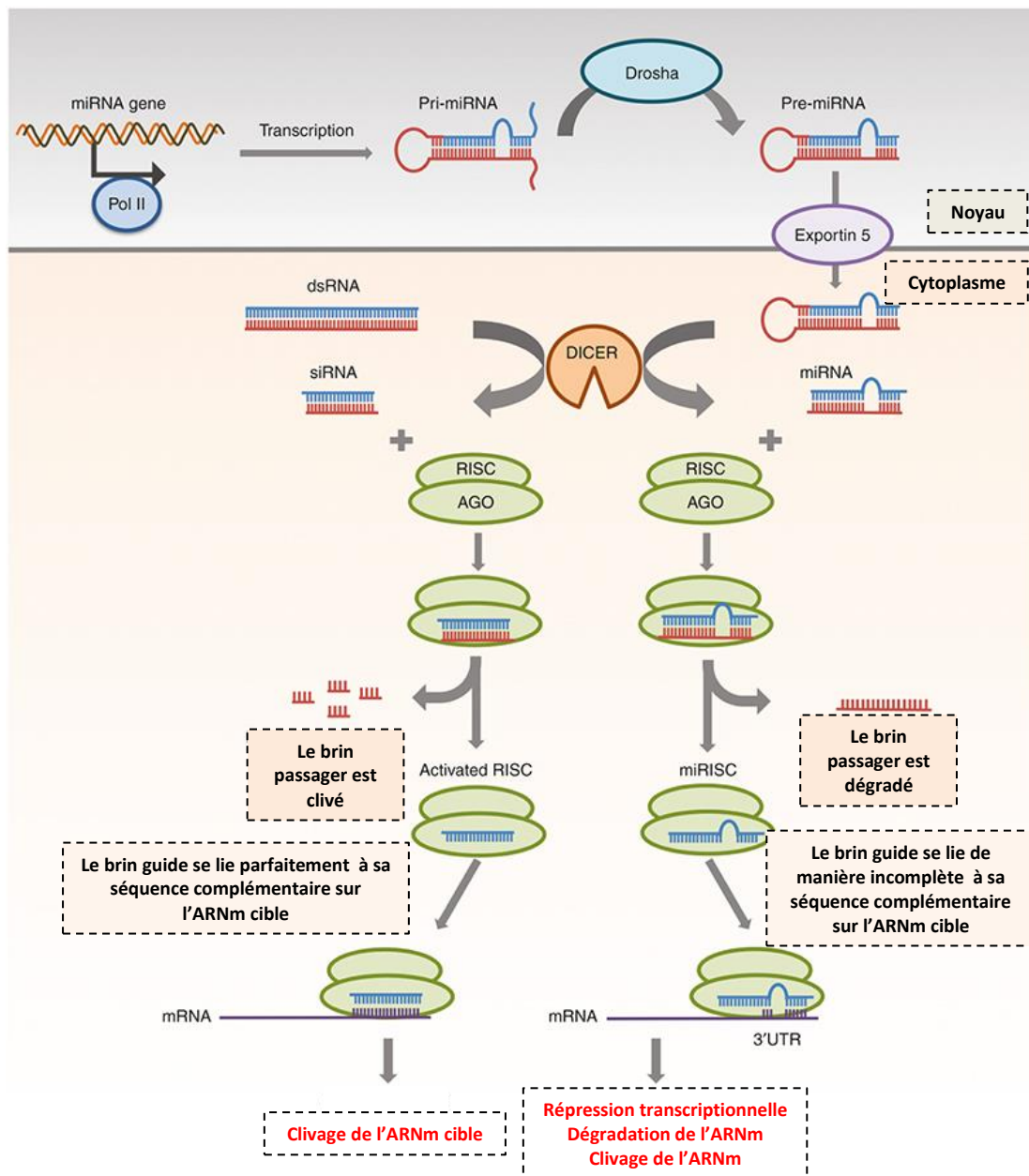


Figure 9. Mécanisme de régulation de l'extinction génique par l'ARN interférence : à gauche, les siRNA et à droite, les miRNA. Adapté de (Lam et al., 2015).

b) Les siRNA

Les siRNA sont de petits ARN synthétiques d'une taille de 21 à 27 nucléotides qui possèdent une structure en double brin avec en 5' les extrémités phosphorylées et en 3' deux nucléotides débordants. L'efficacité des siRNA a été prouvée en 2001 dans des cellules de mammifères ce qui a ouvert un nouveau domaine d'application (Elbashir et al., 2001b). L'existence de siRNA endogènes (endo-siRNA) dans les cellules de mammifères est soumise à controverse en raison de l'absence de RdRp (ARN Polymérase ARN dépendante)

empêchant l'amplification des doubles brins d'ARN (Okamura and Lai, 2008), alors que cette activité est présente dans les cellules animales comme *C. elegans* (Sijen et al., 2001). Les endo-siRNA pourraient provenir de virus, de transposons, de longs transcrits convergents d'ARN et de longs transcrits en tiges boucles. Cependant dans les cellules de mammifères, ils n'ont été trouvés que dans des oocytes de souris (Tam et al., 2008; Watanabe et al., 2008).

Comme les miRNA, les siRNA sont processés *via* le complexe RISC, où le brin passager (sens) est séparé du brin antisens puis éjecté du complexe (**figure 9**). A la différence des miRNA, le brin siRNA guide (antisens) est apparié parfaitement par des liaisons de type Watson-Crick avec sa séquence complémentaire sur l'ARN messenger qui est ensuite clivé.

c) Le complexe RISC et l'extinction génique

Le complexe RISC est un complexe multiprotéique qui permet d'incorporer les miRNA et les siRNA afin d'inhiber la traduction d'un ARN messenger cible. Il a d'abord été identifié dans des cellules de *Drosophila* par l'équipe de G. Hannon en 2000 (Hammond et al., 2000). Les protéines DICER, TRBP et Argonaute 2 forment le RISC Loading Complex (RLC).

DICER est une endonucléase de la famille des RNase III qui permet le découpage des précurseurs de double brin d'ARN des miRNA et des siRNA (Tijsterman and Plasterk, 2004). Elle possède un domaine C-terminal dsRBD (domaine de liaison de l'ARN double brin). Le domaine RNase et le domaine PAZ agissent de concert afin de « mesurer » la taille du double brin et le couper en un morceau d'une taille d'environ 23 nucléotides (Wilson and Doudna, 2013). DICER est nécessaire pour amorcer l'activation du complexe RISC par l'intermédiaire du recrutement d'AGO2 (Doi et al., 2003).

TRBP, est une protéine capable de lier les ARN double brin (dsRNA) grâce à ses 2 domaines dsRBP, qui interviennent dans le chargement des miRNA ou siRNA dans le complexe RISC. Elle se lie à Dicer par son domaine C-terminal (Rossi, 2005a). Après le processing du dsRNA par Dicer pour obtenir un double brin d'ARN plus court, les siRNA ou miRNA sont chargés dans le complexe RISC, grâce à la protéine TRBP pouvant lier ces ARN. Les siRNA ou miRNA sont présentés à la protéine AGO2.

Au cœur du complexe RISC se trouve la protéine AGO2 qui joue un rôle dans le clivage de l'ARNm cible. AGO2 fait partie de la famille Argonaute qui comporte 8 membres chez l'homme, mais il n'y a qu'AGO2 qui joue ce rôle (Janowski et al., 2006). Cette protéine reconnaît les deux derniers nucléotides débordants à l'extrémité 3' du brin guide par l'intermédiaire de son domaine PAZ qui va former une poche (Lingel et al., 2004). Le 5' du brin guide est maintenu par le domaine MID d'AGO2. AGO2 élimine le brin passager du complexe RISC. C'est enfin son domaine PIWI qui est responsable de la dégradation de l'ARNm cible.

Concernant les siRNA, après la reconnaissance de l'ARNm cible, il y a hybridation parfaite entre le siRNA et la séquence complémentaire cible ce qui déclenche le clivage endonucléolytique par AGO2. AGO2 coupe la liaison phosphodiester de l'ARNm située au niveau du 10^{ème} et 11^{ème} nucléotide à partir du 5' du brin guide, et cette réaction est catalysée par le Mg^{2+} (Elbashir et al., 2001a). L'ARNm est finalement dégradé par des exonucléases soit dans les exosomes, impliqué dans la dégradation de tous types d'ARN, soit dans les P-bodies (Processing-bodies). Les P-bodies sont des petits granules situés dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Ils permettent le stockage des ARNm qui seront soit dégradés, soit réengagés dans la traduction (Rossi, 2005b). Dans ces P-bodies se trouvent une panoplie d'enzymes qui participent à la dégradation des ARN, parmi lesquelles, des enzymes agissant dans l'élimination de la coiffe (décapping) (DCP1, DCP2), la dégradation de la queue PolyA (désadénylation) (CCR4-CAF1) et des exonucléases (XRN1) (Kulkarni et al., 2010). Dans les exosomes, la désadénylation est suivie par la dégradation de l'ARNm de l'extrémité 3' à 5' (Anderson and Parker, 1998). AGO2 navigue entre le cytoplasme où se trouve DICER et les P-bodies où s'effectue la dégradation des ARNm (Billy et al., 2001).

Dans le cas des miRNA, il y a deux issues possibles pour les ARNm cibles après hybridation. Les miRNA reconnaissent des séquences dans la région 3'UTR de l'ARNm. En cas de complémentarité parfaite entre la région seed de l'ARNm et le miRNA, l'ARNm sera coupé par AGO2, puis dégradé comme dans le cas des siRNA. En revanche, en cas de mésappariement, l'ARNm sera dirigé dans les P-bodies où il sera désadénylé et décappé ce qui empêche l'initiation de la traduction (Valencia-Sanchez et al., 2006).

Après la dégradation de l'ARNm cible, le complexe RISC reste actif et peut effectuer plusieurs autres cycles (Brown et al., 2005). Ainsi, les siRNA et les miRNA conduisent à l'inhibition de la production de la protéine cible avec une très grande efficacité, que ce soit en inhibant la traduction ou en dégradant l'ARNm.

2. Les siRNA et miRNA comme agents thérapeutiques

De par leur appariement spécifique avec l'ARN messager, les ARN interférents ont démontré un énorme potentiel comme agent thérapeutique.

Sur la base de l'étude de quelques gènes cibles et par bioinformatique, plusieurs groupes ont proposé des règles pour la conception du « siRNA parfait » afin de maximaliser les chances d'obtenir l'extinction de la traduction. En général, les siRNA sont produits avec une longueur de 23 nucléotides et deux nucléotides débordants. L'équipe d'Elbashir propose de créer des siRNA sur le modèle suivant : 5' AA-19 nucléotides-TT 3', où les 19 nucléotides sont une séquence complémentaire à la séquence cible sur l'ARNm (Elbashir et al., 2001c). Les extrémités 3' TT permettent de rendre plus stable le duplexe et de faciliter son incorporation dans le complexe RISC. Le choix de la cible sur l'ARNm est également crucial. Il est préférable d'éviter de cibler le milieu de l'ARNm, d'éviter les séquences répétées et donc de choisir une cible à environ 50 - 100 nucléotides à partir du début de la séquence codante sur l'ARNm (Hsieh et al., 2004). Les séquences introniques sont également à éviter puisque l'ARN interférence est un mécanisme prenant place dans le cytoplasme et non dans le noyau. Il a été défini un pourcentage optimal de nucléotides G et C dans la séquence du siRNA qui se situe entre 20 et 50% (Henschel et al., 2004; Liu et al., 2012; Reynolds et al., 2004). Plusieurs groupes ont remarqué qu'un contenu plus élevé en nucléotides A/U au début du brin guide permet d'obtenir de meilleurs résultats, puisque ce brin doit être thermodynamiquement moins stable pour être intégré dans le complexe RISC (Shabalina et al., 2006; Ui-Tei et al., 2004). Tous ces paramètres ont été intégrés dans des algorithmes disponibles en ligne (**tableau 7**).

Tableau 7. Outils bioinformatiques disponibles pour la conception de siRNA en déterminant la séquence optimale

Nom du site internet	URL	Référence
siDirect 2.0	http://sidirect2.rnai.jp/	(Naito et al., 2009)
siRNA Wizard v3.1	http://www.invivogen.com/sirnawizard/selection.php	(Elbashir et al., 2002)
i-Score	http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html	(Ichihara et al., 2007)
OligoWalk	http://rna.urmc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi	(Lu and Mathews, 2008)
OptiRNAi	http://rna.nci.nih.gov/	(Cui et al., 2004)

Dans le cas des miRNA, plusieurs molécules synthétiques ont été développées soit pour inhiber l'action de miRNA, soit pour les remplacer (**figure 10**).

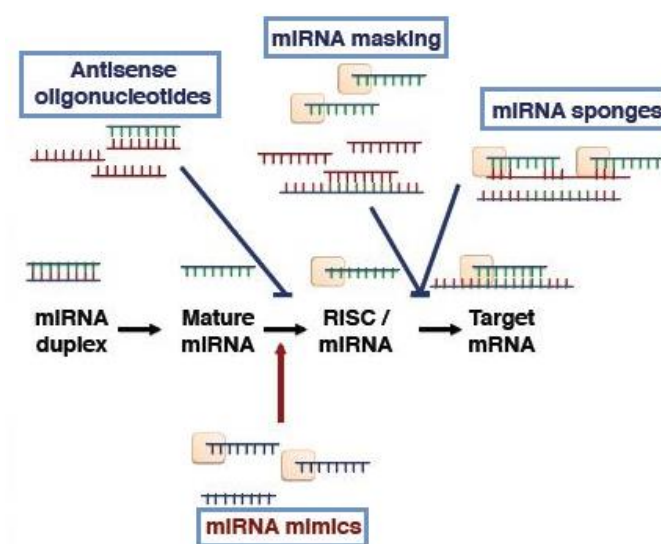


Figure 10. Différentes stratégies d'utilisation des miRNA thérapeutiques : les anti-miRNAs, les miRNA masking, les miRNA sponges, et les miRNA mimics (Garzon et al., 2010).

Pour remplacer un miRNA non fonctionnel, les molécules utilisées sont les miRNA mimics qui sont des miRNA synthétiques doubles brins similaires aux miRNA endogènes mais comportant des modifications chimiques (2'fluoro, 2'OMethyl). Ceux-ci sont doubles brins car ils présentent une meilleure efficacité que les simples brins (Bader et al., 2011). Ils sont utilisés comme suppresseur de tumeur, telle la famille du miR-34 impliquée dans l'inhibition du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire et de la formation des métastases (Bader et al., 2011).

Il est aussi possible d'inhiber des miRNA. Cet aspect a été d'abord introduit en 2005 par l'équipe de M. Stoffel, avec l'utilisation d'antagomiRs pour inhiber le miR-122, un miR spécifique du foie joue un rôle dans la répllication du virus de l'Hépatite C (Krützfeldt et al., 2005). Cet antagomiR est un oligonucléotide simple brin complémentaire du miR-122 endogène et comporte des modifications chimiques telles des groupements phosphorothioates et la méthylation de l'hydroxyle 2' du ribose. Il se lie au miR, l'empêchant ainsi de s'hybrider à sa cible sur l'ARNm. *In vivo*, cet antagomiR-122 a permis de réduire spécifiquement les niveaux d'expression du miR-122 chez la souris.

Une deuxième stratégie pour inhiber les miRNA est l'utilisation de miR sponge. Il s'agit d'un ARN comportant plusieurs sites de liaison à des miRNA qui va agir comme un leurre (Ebert et al., 2007). Il peut ainsi inhiber l'expression d'une famille de miRNA qui partage la même région seed sur différents ARNm. Ils peuvent comporter de 4 à 10 séquences de fixation des miRNA séparées de quelques nucléotides. Un miR sponge peut être délivré par un lentivirus (Yang et al., 2015), un adénovirus (Moshiri et al., 2014) ou par un plasmide complexé dans un polymère (Gao et al., 2015) comme dans le cas du miR-21.

Dans le cas de l'utilisation de siRNA, il est possible de les générer de plusieurs manières : par synthèse chimique, par synthèse *in vitro*, et par transfert de plasmide shRNA.

Par synthèse chimique, ils sont synthétisés sous forme de siRNA d'une longueur de 21 à 27 nucléotides pouvant être pris en charge par le complexe RISC.

Par transcription *in vitro* d'un plasmide shRNA (Brummelkamp et al., 2002), ce qui permet la formation de siRNA sous forme tige-boucle ou par utilisation de la T7 RNA

polymérase et de petits oligonucléotides comme matrice (Donzé and Picard, 2002). Cette méthode est assez peu répandue car longue et elle ne permet de synthétiser que de faibles quantités de siRNA.

Enfin, par transfection des cellules avec un plasmide shRNA. Il y a transcription par la RNA polymérase III de courts transcrits d'ARN en tige boucle. Le transfert de shRNA permet une expression plus longue de siRNA, environ 3 à 5 jours en culture cellulaire (Holen et al., 2002). Le plasmide peut être inductible afin de réguler sa production et à façon l'extinction de la protéine cible (Kiss et al., 2012). D'autre part, la transfection stable d'un plasmide codant un shRNA peut permettre de générer une extinction durable de la protéine cible. Cependant, le transfert d'un plasmide shRNA est soumis aux mêmes limites que celui du transfert de gènes en général et notamment le passage nucléaire dans des cellules qui ne se divisent pas.

III. Vectorisation des siRNA

A. Conjugués de siRNA

En raison de leur taille et de leur charge, les siRNA ne sont pas capables de traverser facilement les membranes biologiques. Cependant, ils peuvent être vectorisés en les conjuguant à d'autres molécules. Il est primordial que le conjugué obtenu n'empêche pas la prise en charge des siRNA par le complexe RISC.

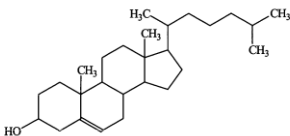
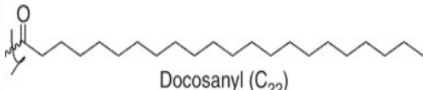
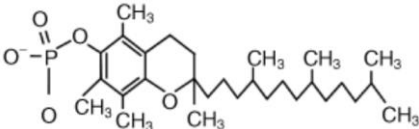
1. Conjugaison d'un siRNA à un lipide

La première molécule à avoir été conjuguée a été le cholestérol. La conjugaison du cholestérol à un siRNA est plutôt adaptée à une délivrance dans le foie. Le couplage d'un groupe cholestérol à un siRNA permet d'augmenter le temps de circulation sanguine en se liant notamment aux protéines LDL (low-density lipoprotein) et HDL (high-density lipoprotein). Ces deux protéines sont impliquées dans le transport du cholestérol,

favorisant l'internalisation des siRNA dans les cellules hépatiques *via* les récepteurs aux LDL et HDL (Wolfrum et al., 2007).

Des lipides à longue chaîne carbonée ont également été conjugués à des siRNA. Le groupe de M. Stoffel a couplé des lipides avec une chaîne aliphatique de 12 à 22 carbones (Wolfrum et al., 2007). En utilisant les siRNA couplés au cholestérol ou au docosanyl (22 carbones), une diminution de 50% de l'ARNm d'apo-B a été détectée dans le foie de souris (**tableau 8**).

Tableau 8. Quelques exemples de siRNA conjugués à des groupements lipidiques.

Nom du siRNA conjugué	Lieu de fixation du lipide	Lipide conjugué	Référence
siRNA-cholesterol	Brin sens en 3' <i>via</i> un bras pyrrolidine		(Soutschek et al., 2004)
siRNA-docosanyl	Brin sens en 3' <i>via</i> un bras trans-4-hydroxyprolinol	 Docosanyl (C ₂₂)	(Wolfrum et al., 2007)
siRNA-α-tocopherol	Brin antisens en 5' sur le groupe phosphate du ribose		(Nishina et al., 2008)

2. Conjugaison d'un siRNA à un oligosaccharide

Les oligosaccharides peuvent être également employés pour vectoriser des siRNA. Le N-acetylgalactosamine (GalNac), un ligand du récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR), situé à la surface des cellules hépatiques, a été couplé à des siRNA (**figure 11**) (Nair et al., 2014). Notamment, des siRNA ont été couplés à des bi-antennes ou des tri-antennes de GalNac. Cette stratégie fut également développée dans le cadre de la vectorisation d'oligonucléotides antisens (Prakash et al., 2014).

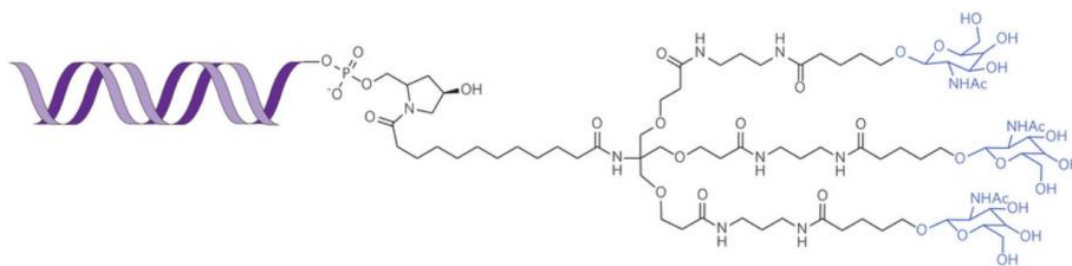


Figure 11. siRNA conjugué à une tri-antenne de GalNac.

Sous le nom d'ALN-TTRsc ou encore Revusiran, les siRNA-GalNac développés par Alnylam Pharmaceuticals sont entrés en essai clinique de phase I pour le traitement de l'amylose à transthyrétine (Zimmermann et al., 2013). Les siRNA ont pour cible le gène de la transthyrétine qui lorsqu'il est muté provoque des dépôts amyloïdes. Les résultats de cet essai clinique ont montré une réduction de 90% de la protéine dans le sérum.

Un autre essai clinique de phase I concernant le traitement de l'hémophilie A et B utilise également un siRNA-GalNac (Sehgal et al., 2015). L'ALN-AT3, ciblant le gène de l'antithrombine 3 a permis la réduction de 60% de la thrombine 3 dans le sérum.

Des siRNA ont été conjugués à un polymère substitué avec du GalNac. Les siRNA ont été liés au poly(vinyl ether) (PBAVE) par un pont disulfure. Sur le squelette du polymère, sont attachés des groupements de PEG (polyéthylèneglycol) ainsi que des résidus GalNac (NAG) pour un adressage tissulaire (**figure 12**) (Rozema et al., 2007). Après injection intraveineuse de ces conjugués (siRNA-DPC), les siRNA qui sont protégés de la dégradation par les groupements PEG sont reconnus et pénètrent dans le foie *via* les groupes GalNac et le récepteur ASGPR. Dans l'environnement acide des endosomes, le relargage des groupes NAG et PEG s'opèrent dévoilant le polymère PBAVE à activité endosomolytique. La rupture de l'endosome entraîne le relargage du siRNA libéré du polymère. Ces conjugués ont permis chez la souris l'inhibition de deux gènes exprimés dans le foie, apoB et ppar (peroxisome proliferator-activated receptor). Les siRNA-DPC sont non toxiques et bien tolérés par les animaux.

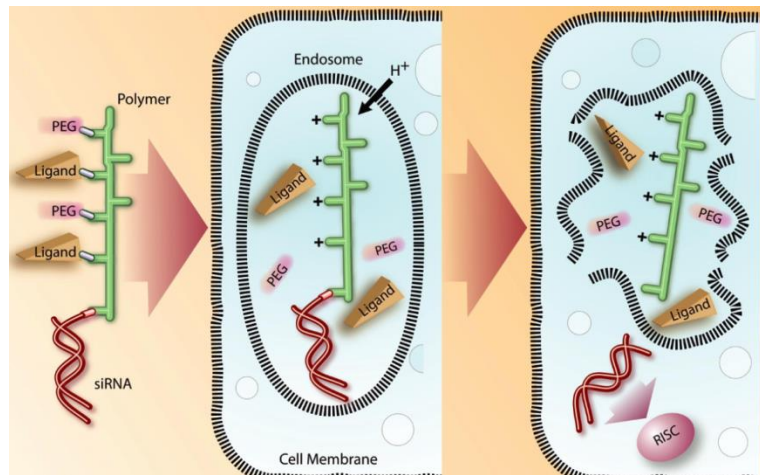


Figure 12. Illustration de la délivrance de siRNA par les siRNA-DPC (Rozema et al., 2007)

La polylysine conjuguée à des siRNA a été synthétisée par le groupe d'E. Wagner (Meyer et al., 2009). Les siRNA sont couplés à de la polylysine substituée par des groupements PEG et de la melittine (DMMA_n-Mel) (**figure 13**). Dans les endosomes acides, le groupement DMMA_n sur la melittine est relargué ce qui démasque la melittine, un peptide fusogénique qui va déstabiliser les endosomes et entraîner la sortie du siRNA puis sa libération de la polylysine après coupure du pont disulfure entre le PEG et l'extrémité 5' du brin sens. Malgré des résultats *in vitro* encourageants, les études *in vivo* ont montré une haute toxicité de ces conjugués voire létale à une dose de 25 µg de siRNA. Des optimisations seront nécessaires pour une utilisation thérapeutique.

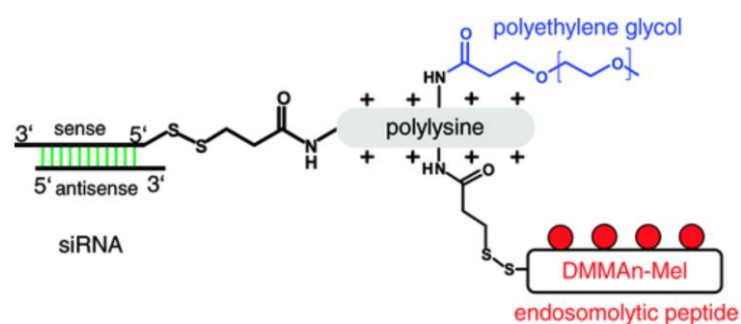


Figure 13. Schéma du siRNA-polylysine (Meyer et al., 2009).

3. Conjugaison d'un siRNA à un peptide

Des siRNA ont été couplés à des CPP (Cell Penetrating Peptides) qui sont des petits peptides (trente acides aminés) positivement chargés et passent à travers la membrane cellulaire indépendamment de la présence de récepteurs (Hoyer and Neundorf, 2012).

La pénétratine et le transportan ont été couplés à l'extrémité 5' du brin sens des siRNA par un pont disulfure entre une cystéine du peptide et un groupe thiol présent sur le siRNA modifié (**figure 14**) (Muratovska and Eccles, 2004). Une molécule de cyanine 3 (Cy3) est également couplée à l'extrémité 5' du brin antisens afin de suivre ces siRNA. La pénétratine est un petit peptide cationique originaire de l'homéodomaine Antennapedia chez la drosophile (Derossi et al., 1996). Le transportan est un peptide cationique dérivé de la combinaison de deux peptides, la galanine (un neuropeptide) et le mastoparan (un peptide provenant du venin de la guêpe) (Pooga et al., 1998). Ces deux peptides couplés à des siRNA permettent d'induire une extinction de la luciférase plus importante que celle obtenue par la Lipofectamine, dans des cultures de cellules de mammifères.

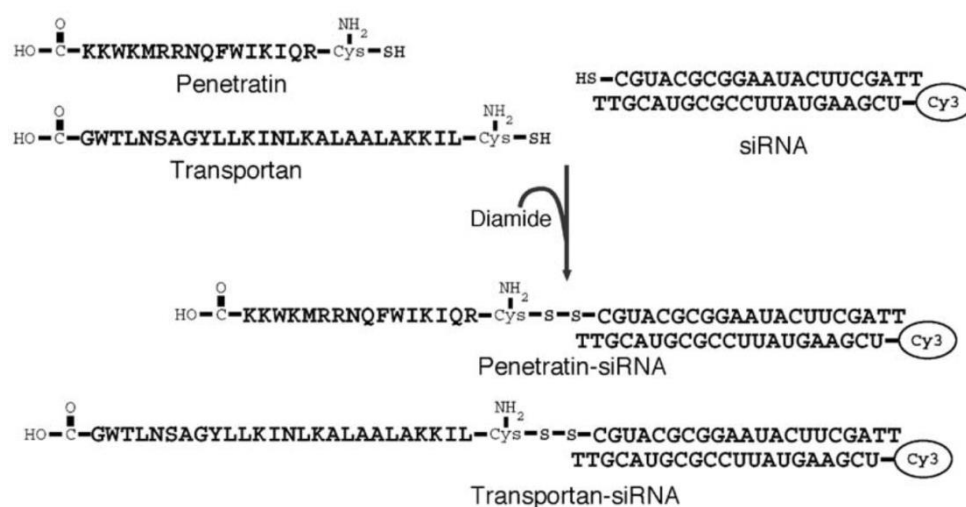


Figure 14. Stratégie de couplage des CPP sur les siRNA (Muratovska and Eccles, 2004).

B. Nanoparticules de siRNA

Les polymères et les lipides cationiques développés pour le transfert de gènes sont également utilisés pour la vectorisation de siRNA. Ces vecteurs forment des complexes avec les acides nucléiques par interactions électrostatiques pour former des nanoparticules. Ces vecteurs font l'objet de nombreuses recherches et sont désormais de natures diverses et variées afin de s'adapter à chaque condition. Il en existe plusieurs classes qui se répartissent en polymères, liposomes, peptides et particules inorganiques. Les challenges actuels sont de créer ces particules capables de traverser toutes les barrières extracellulaires et intracellulaires.

1. Polymères cationiques

Ils interagissent avec les acides nucléiques pour former des complexes électrostatiques appelées polyplexes d'une centaine de nanomètres. Le « gold standard » est la polyéthylèneimine (PEI, 800kDa) (Boussif et al., 1995). Il s'agit d'un polymère cationique composé d'unités répétées de groupes amines séparées par deux carbones. La PEI peut être branchée et contenir des amines primaires, secondaires et tertiaires ayant des pKa différents (**figure 15**). Dans les vésicules d'endocytose acides (endosomes, lysosomes) les amines non chargées à pH neutre (amines secondaires et tertiaires) vont capturer des protons H^+ en milieu acide, ce qui va induire par un phénomène « éponge à protons » une entrée d'eau entraînant la rupture des vésicules notamment des endosomes.

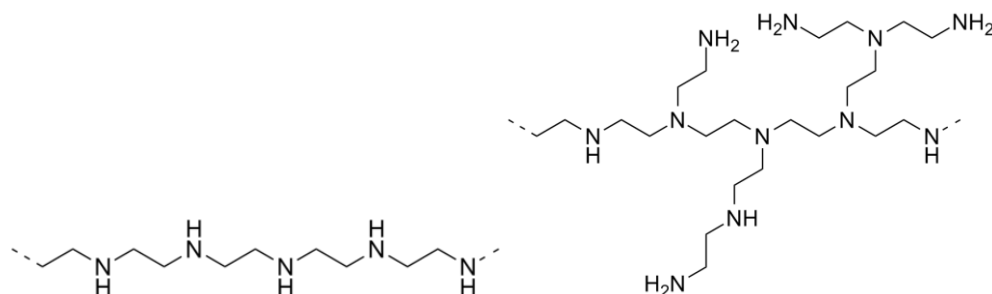


Figure 15. A/ Exemple de PEI linéaire B/ Exemple de PEI branchée.

Cependant, bien que cet agent de transfection ait prouvé son efficacité dans la délivrance d'ADN, ceci s'avère assez différent dans le cas des siRNA. En effet, la condensation des siRNA avec le polymère cationique est différente de celle d'avec l'ADN puisque la longueur de persistance d'un double brin d'ARN est d'environ 70 nm (Hagerman, 1997) alors que pour l'ADN elle est de 50 nm (150 nucléotides) (Chi et al., 2013). Ceci implique qu'une molécule de siRNA de 23 nucléotides qui possède une taille d'environ 7.5 nm, n'est pas du tout flexible. La condensation des siRNA par un polymère tel que la PEI est moins stable qu'avec un plasmide ADN plus gros (Kwok and Hart, 2011).

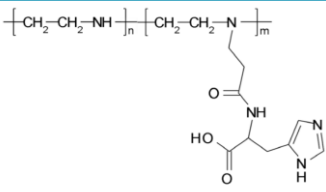
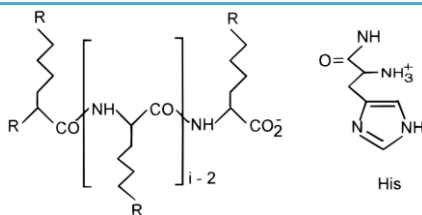
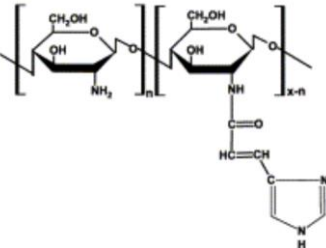
Les résultats ont tendance à différer entre plusieurs groupes de recherche. L'étude de Richards Grayson *et al.* portant sur différents types de PEI (branchée et linéaire) montre *in vitro* une activité des siRNA que dans des conditions restreintes en utilisant de grandes quantités de siRNA (200 nM) et en complexation avec la PEI branchée de 25kDa (Richards Grayson et al., 2006). *In vivo*, Hassani *et al.* en utilisant la jetPEI (PEI linéaire, Polyplus Transfection) montrent une efficacité significative dans le cerveau de souris, de siRNA à des doses d'1 pmol (Hassani et al., 2005). Des résultats probants ont néanmoins été obtenus en utilisant la PEI pour la délivrance *in vivo* de siRNA anti-HER2 à une dose de 0.6 nmol, complexés avec la jetPEI, dans un modèle de tumeurs ovariennes sous cutanées (Urban-Klein et al., 2005). Dans d'autres études, la PEI branchée a été utilisée avec succès pour le transfert de siRNA *in vivo* dans le cancer de la prostate (Kim et al., 2008), du poumon (Zamora-Avila et al., 2009) ou du pancréas (Zhu et al., 2006).

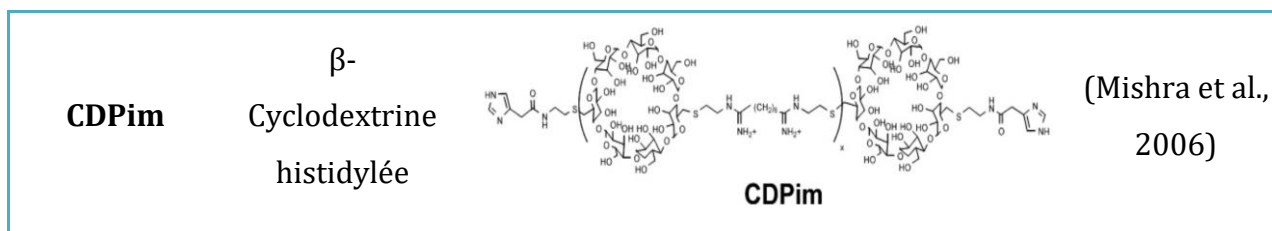
De nombreuses PEI modifiées ont été développées afin de diminuer les problèmes de biocompatibilité et de toxicité (Godbey et al., 2001). Ceci commence par l'ajout de molécules de PEG sur le squelette de la PEI ce qui améliore la stabilité du complexe siRNA/PEI notamment pour la délivrance pulmonaire (Merkel et al., 2009). De plus, l'ajout de PEG apporte une furtivité dans la circulation sanguine. Les modifications comprennent également la substitution des groupes amino de la PEI soit avec des groupes acétate, butanoate, hexanoate ou des groupes alkyne carboxylate (Doody et al., 2006; Forrest et al., 2004; Oskuee et al., 2010; Thomas and Klibanov, 2002). Bien que ces substitutions de groupes aminés réduisent le nombre de groupe amino sur la PEI et ainsi sa cytotoxicité, ils

n'améliorent pas l'efficacité de transfection. D'autres modifications ont été apportées en couplant la PEI au chitosan (Huh et al., 2010), ou encore à l'acide hyaluronique (Jiang et al., 2009). Ce dernier couplage permet l'amélioration de la stabilité du polyplexe dans le sérum et augmente son endocytose par les récepteurs à l'acide hyaluronique.

Afin d'améliorer l'effet éponge à protons, des groupes protonables à pH acide ont été greffés aux polymères (**tableau 9**). Parmi ceux-ci, l'histidine, une base faible possédant un noyau imidazole dont le pKa est de 6,0. Au laboratoire, des polymères substitués par des groupes histidine ont été développés pour le transfert de gènes. La polylysine, a été le premier polymère partiellement substitué par des résidus histidines (Midoux and Monsigny, 1999). De même, la substitution partielle de la lPEI avec des résidus histidylés permet d'améliorer le transfert de plasmide ADN dans des cellules de mammifères tout en réduisant la cytotoxicité (Bertrand et al., 2011). La structure de ces deux polymères histidylés figure dans le tableau ainsi que d'autres utilisés pour le transfert de gènes (Midoux et al., 2009).

Tableau 9. Polymères substitués par des noyaux imidazoles ou des histidines utilisés en transfert de gènes.

Nom du polymère	Type de polymère	Structure	Référence
His-lPEI	lPEI substituée par 16% de résidus histidine		(Bertrand et al., 2011)
His-pLK (HpK)	Polylysine de 190 résidus substituée par 50% d'histidine	 R= NH₃⁺ ou His	(Midoux and Monsigny, 1999; Pichon et al., 2001)
UAC	Chitosan substitué par de l'imidazole		(Kim et al., 2003b)



Des copolymères d'histidine et de lysine ont été utilisés pour la délivrance de siRNA *in vitro*. Le copolymère H³K8b (**figure 16**) permet une internalisation efficace de siRNA ainsi qu'une inhibition significative de gènes. L'ajout du groupement RGD ligand des intégrines sur ce polymère a permis d'augmenter l'efficacité (Leng et al., 2005). De plus, la toxicité de ces polyplexes est cinq fois plus faible que celle des vecteurs commerciaux, comme la Lipofectamine.

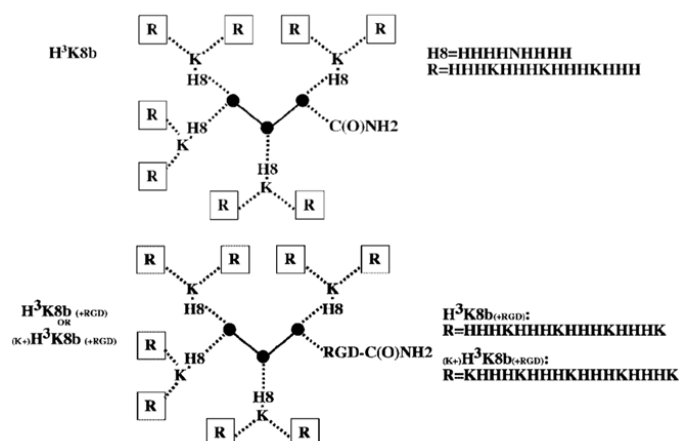


Figure 16. Structure des copolymères H3K8b et H3K8b-RGD (Leng et al., 2005).

Le copolymère H3K(+H)4b (**figure 17**), a été utilisé *in vivo* dans un modèle de souris nues portant des tumeurs développées en sous-cutané après injection de cellules MDA-MB-435 (des cellules humaines du cancer mammaire) (Leng et al., 2008). La délivrance d'un siRNA dirigé contre Raf-1, un oncogène impliqué dans la voie des MAP3 kinase, a permis la diminution du volume tumoral de 50% en comparaison à des souris non traitées.



Figure 17. Structure des copolymères H3K(+H)4b (Leng et al., 2012).

La polylysine, premier agent de transfection utilisé pour le transfert d'ADN (Wu and Wu, 1987), a été également développé pour la complexation des siRNA. Un dendrimère de lysine de sixième génération (**figure 18**) a été utilisé pour délivrer un siRNA dirigé contre apoB dans le traitement de l'hypercholestérolémie, sans induire de toxicité hépatique (Watanabe et al., 2009).

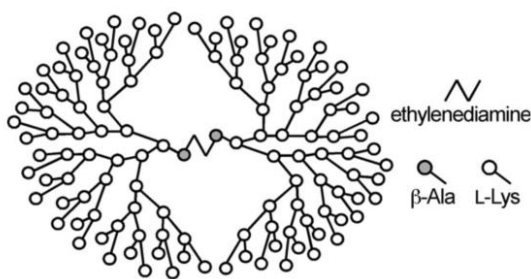


Figure 18. Structure du dendrimère de polylysine (Watanabe et al., 2009)

Un des premiers polymères à avoir été utilisé *in vivo* est le PLGA (Acide Poly-Lactique-co-Glycolique) (Khan et al., 2004). Le PLGA, est biocompatible, biodégradable et est autorisé par la FDA en utilisation thérapeutique. Il s'agit d'un copolymère de deux monomères : l'acide glycolique et l'acide lactique (**figure 19**). Contrairement à la PEI et à la polylysine, le PLGA n'interagit pas par interactions électrostatiques avec les siRNA, puisque ce polymère n'est pas chargé. L'encapsulation des siRNA est réalisée par double-émulsion du PLGA avec les siRNA (Cun et al., 2010). Afin d'améliorer l'interaction du PLGA avec les siRNA, des chaînes latérales chargées positivement ont été greffées, comme dans le cas du DEAPA-PVA (diethylaminopropylamine polyvinyl alcohol) (Nguyen et al., 2008). Une autre modification a consisté à incorporer du chitosan au PLGA ce qui augmente aussi l'efficacité de transfection (Chen et al., 2012b; Jagani et al., 2013).

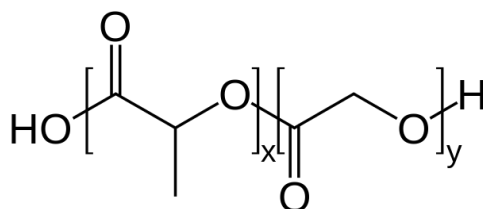
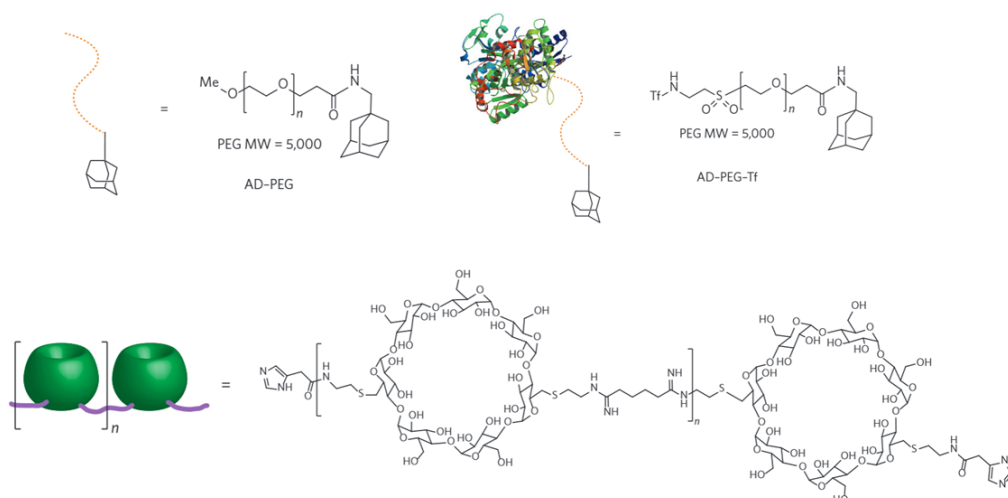


Figure 19. Structure du PLGA non modifié, x : acide lactique ; y, acide glycolique.

Le polymère cationique CDPim est constitué de la polymérisation de motifs de β -cyclodextrine lié à un bras cationique dont les deux extrémités sont terminées par un groupe imidazole (**tableau 9**). (Gonzalez et al., 1999). La cyclodextrine possède une cavité capable d'accueillir des petites molécules hydrophobes dans son cœur cyclique et en particulier l'adamantane qui a été utilisé pour conférer une activité ciblante au CDPim. Ainsi, des molécules d'adamantane-PEG et d'adamantane-PEG-transferrine ont été associées au CDPim par inclusion de la partie adamantane dans la cavité de la β -cyclodextrine (**figure 20**) (Bellocq et al., 2003). L'adamantane-PEG apporte une furtivité aux complexes siRNA dans la circulation sanguine. L'adamantane-PEG-transferrine permet le ciblage des cellules surexprimant le récepteur à la transferrine (Bartlett et al., 2007). L'autoassemblage de ce polymère avec le siRNA forme une nanoparticule qui possède une taille finale de 70nm. Elle comprend en moyenne 2000 molécules de siRNA complexées avec 10 000 polymères de cyclodextrine, ciblée par 100 molécules d'adamantane-PEG-transferrine (Bartlett and Davis, 2007).



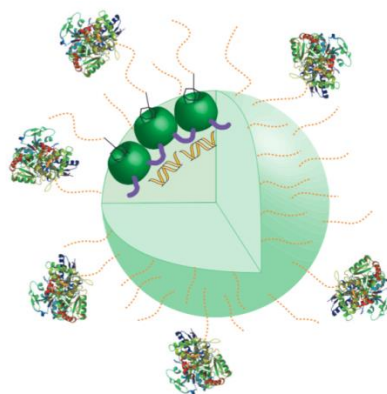


Figure 20. Assemblage de la nanoparticule de cyclodextrine.

Dans un modèle murin de sarcome d'Ewing, la délivrance systémique de siRNA dirigé contre l'ARNm d'EWS-FLI1 complexés avec le CDPim a permis une baisse de la prolifération cellulaire (Hu-Lieskovan et al., 2005). Dans un deuxième modèle, des souris greffées avec des tumeurs syngéniques de neuroblastome ont reçu la cyclodextrine-siRNA anti-RRM2. Les nanoparticules ciblées par la transferrine ont permis de diminuer significativement la croissance tumorale par rapport aux nanoparticules non ciblées (Bartlett et al., 2007). Ce même système a été utilisé chez le singe pour évaluer la dose maximale tolérée par injection intraveineuse. A des doses de 3 et 9 mg de siRNA/kg, la nanoparticule est bien tolérée cependant une toxicité rénale est détectée à 27mg/kg (Heidel et al., 2007). La preuve de principe démontrée chez la souris a encouragé le développement de cette nanoparticule appelée désormais RONDEL, pour RNAi Oligonucleotide Nanoparticle Delivery, et développée par Calando Pharmaceuticals. En 2008, le premier candidat à un essai clinique fut CALAA-01, cette nanoparticule contenant le siRNA anti-RRM2 a été délivrée chez des patients portant des tumeurs solides de mélanome. Les premiers résultats publiés en 2010, montraient sur des biopsies de tumeurs chez des patients traités, une réduction de cet ARNm RRM2 (Davis et al., 2010). Des doses croissantes de CALAA-01 de 3 à 30 mg/m² ont été également injectées par intraveineuse et la dose limitante n'a pas été atteinte (Zuckerman et al., 2014). Cependant, des effets secondaires ont été observés (bouffées de chaleur, fièvre, fatigue) qui seraient dus au polymère qui nécessite des optimisations.

Les dendrimères sont des polymères qui ont également été utilisés pour la délivrance de siRNA. Il s'agit de molécules à l'architecture très ordonnée, possédant un

cœur sur lequel sont branchés des groupes répétitifs et symétriques. Le plus étudié est le PAMAM (poly(amidoamine)), aussi référencé sous le nom commercial de Starburst (Tomalia et al., 1985). Ce dendrimère est facilement modifiable, pour améliorer la complexation ou le passage à travers les membranes. Pour le premier cas, la modification peut être réalisée par différentes molécules, comme le triéthanolamine (TEA) qui sert de cœur et pour la pénétration des membranes, l'arginine est rajoutée (**figure 21**) (Liu et al., 2014).

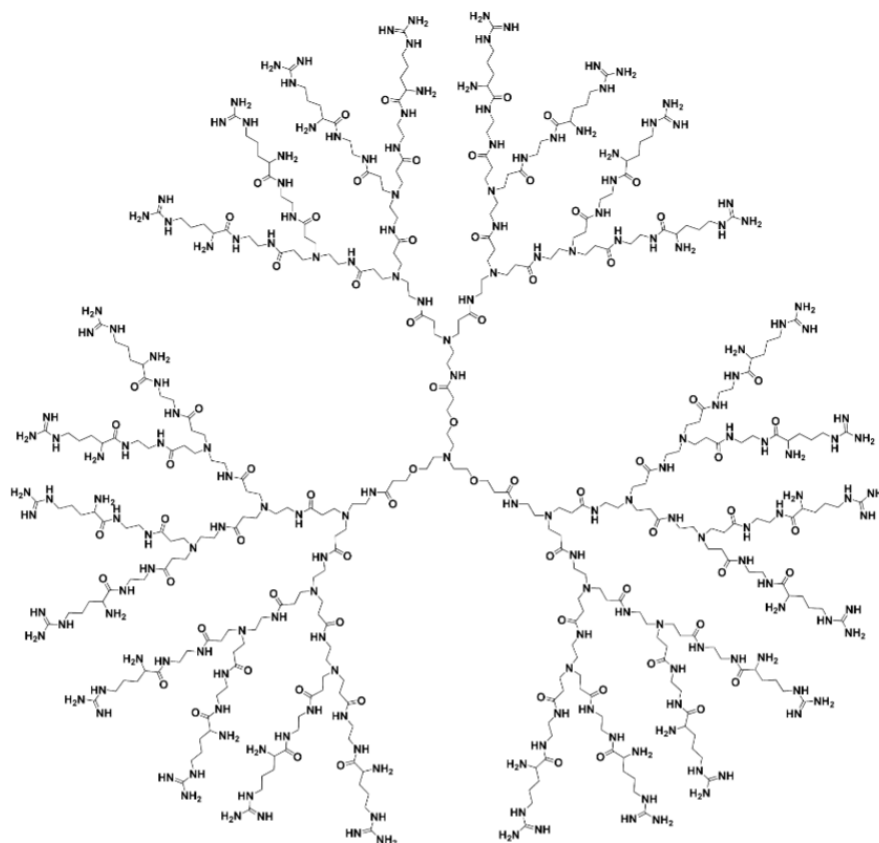


Figure 21. Structure chimique du dendrimère G4Arg possédant un cœur TEA et modifiés par des résidus arginine (Liu et al., 2014)

2. Liposomes cationiques

Les liposomes sont des vésicules formées de lipides naturels ou synthétiques, avec une bicouche lipidique et un espace interne capable d'encapsuler des molécules (Torchilin, 2005). En clinique, il existe plusieurs formulations médicamenteuses commercialisées sous forme de liposome dont voici une liste non exhaustive présentée en **tableau 10**.

Tableau 10. Liposomes commercialisés dans le traitement de différentes affections, adapté de (Immordino et al., 2006).

Nom et date de commercialisation	Composition du liposome	Molécule encapsulée	Maladie traitée	Compagnie pharmaceutique
Doxil®/Caelyx® 1997	HSPC/Chol/DSPE-PEG	Doxorubicine	Sarcome de Kaposi	Sequus Pharmaceuticals
Myocet®/Evacet® 2000	EPC/Chol	Doxorubicine	Cancer du sein métastatique	Elan Pharma
DaunoXome® 1995	DSPC/Chol	Daunorubicine	Sarcome de Kaposi	Nexstar Pharmaceuticals
Depocyt® 1999	DOPC/DPPG/Chol/triolein	Cytarabine	Méningite lymphocytaire	SkyePharma

HSPC : Hydro Soy L- α -phosphatidylcholine ; Chol : Cholestérol ; DSPE-PEG : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] ; EPC : egg phosphatidylcholine ; DSPC : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; DOPC : 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; DPPG : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol.

C'est en 1987, que fut utilisé pour le transfert de gènes, le premier liposome cationique composé de DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (Felgner et al., 1987). Les premiers liposomes cationiques commercialisés sous le nom Lipofectin® étaient constitués du DOTMA et du co-lipide neutre, le DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine) dans un rapport molaire 1/1. Depuis, la recherche dans ce domaine a permis de créer de nombreux autres lipides cationiques et formulations en faisant varier les paramètres tels que la longueur de la chaîne carbonée, la structure et la taille de la tête polaire, qui va directement influencer sur leur taille, leur charge et leur stabilité (Balazs and Godbey, 2010).

L'interaction des liposomes cationiques avec les acides nucléiques donne une structure appelée lipoplexe. Il a été montré par Rädler en 1997 que les lipoplexes présentaient une structure particulière dans laquelle l'ADN s'intercale entre les bicouches lipidiques. Une structure multi-lamellaire avec alternance de bicouches lipidiques et de couches d'ADN a été mise en évidence par diffraction aux rayons X (**figure 22**) (Rädler et al., 1997).

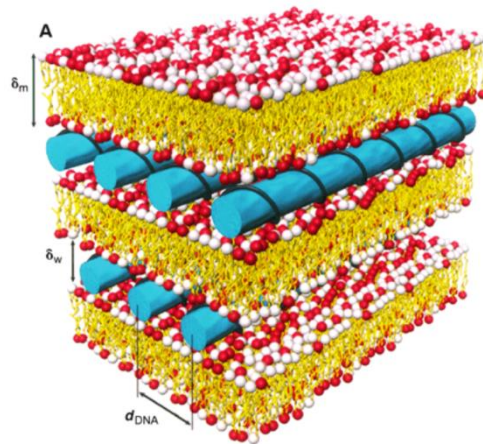


Figure 22. Structure schématique de l'interaction de l'ADN avec les bicouches lipidiques (Rädler et al., 1997).

Les liposomes cationiques sont constitués d'au moins deux types de lipides. Un lipide cationique qui va interagir *via* sa tête cationique avec les charges négatives des phosphates des acides nucléiques, un lipide « helper » ou co-lipide neutre qui permet de réduire le nombre de charges positives des liposomes et leur toxicité due au lipide cationique non naturel. Le co-lipide va également permettre l'échappement endosomal. Un lipide portant un ligand peut-être incorporé pour l'adressage cellulaire. Concernant la structure du lipide cationique, il est toujours composé d'une tête polaire hydrophile, un groupement intermédiaire (spacer) et de deux chaînes aliphatiques hydrophobes ou bien du cholestérol (**Figure 23**). Les lipides cationiques les plus utilisés sont listés dans le **tableau 11**.

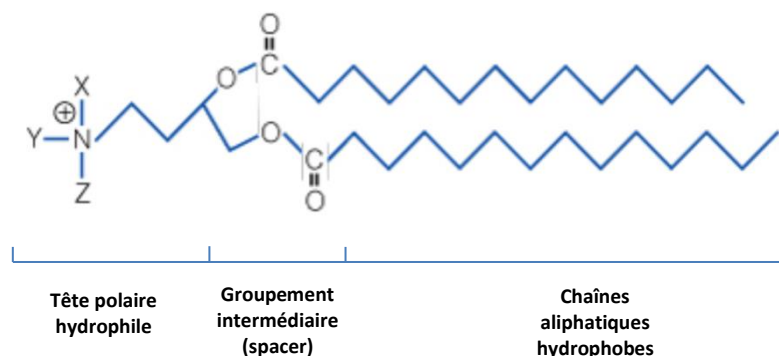
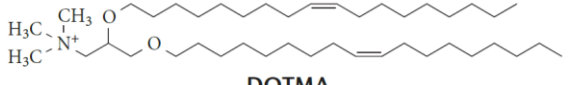
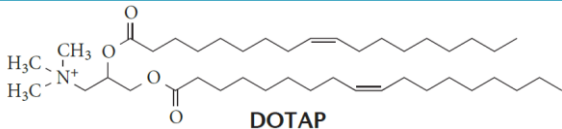
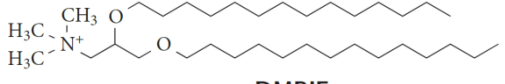
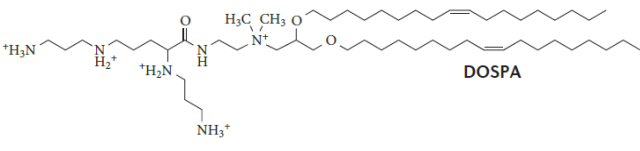
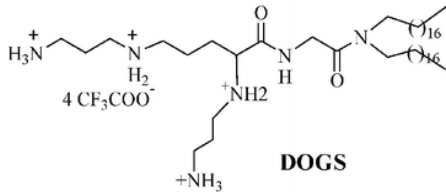
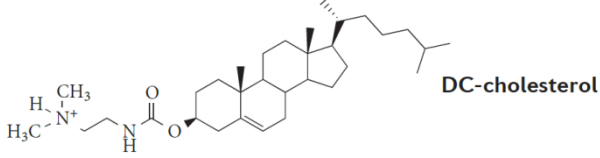


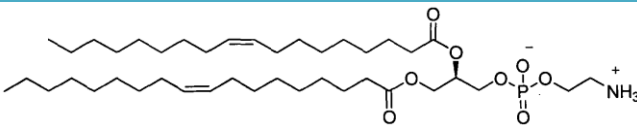
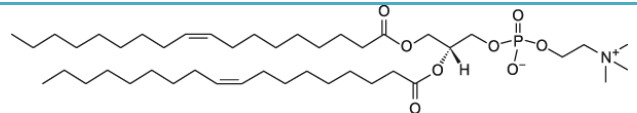
Figure 23. Structure classique d'un lipide cationique (promega.com)

Tableau 11. Lipides cationiques les plus couramment utilisés.

Nom du lipide	Formule chimique
DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride	 DOTMA
DOTAP [1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane]	 DOTAP
DMRIE 1,2-dimyristyloxy-propyl-3-dimethylhydroxyethylammonium bromide	 DMRIE
DOSPA {2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-l-propanaminium trifluoroacetate}	 DOSPA
DOGS Di-octadecyl-amido-glycyl-spermine	 DOGS
DC-Chol 3β-[N-(Dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol	 DC-cholesterol

Le lipide helper le plus utilisé est le DOPE. Il induit un changement de phase (lamellaire vers hexagonale) dans la bicouche des lipoplexes en milieu acide provoquant ainsi la déstabilisation de la membrane endosomale (Lin et al., 2003). L'utilisation de ce lipide augmente l'efficacité de transfection dans différents types cellulaires (Farhood et al., 1994; Simões et al., 1998). Les lipides fusogènes les plus utilisés sont répertoriés dans le **tableau 12**.

Tableau 12. Lipides helper les plus couramment utilisés

Nom du lipide	Formule chimique
DOPE dioleoylphosphatidylethanolamine	
DOPC dioleoylphosphatidylcholine	

Les liposomes cationiques possèdent une demi-vie courte dans la circulation sanguine, ils sont reconnus par le système réticuloendothélial puis dégradés par le système immunitaire (Scherphof et al., 1985). Il s'agit des opsonines qui vont s'accrocher à la surface des liposomes et enclencher leur reconnaissance par le système réticuloendothélial. Parmi ces opsonines, il y a des immunoglobulines (Patel, 1992) et la protéine C-réactive (CRP), qui va se fixer sur les précédentes et activer le système du complément (Volanakis and Narkates, 1981). Afin de pallier à ce problème, Blume *et. al.*, en 1990, ont démontré que l'insertion d'un lipide PEGylé (PE-PEG, phosphatidylethanolamine-polyéthylène glycol 5000) dans la bicouche des liposomes diminue considérablement la clairance des liposomes et des lipoplexes dans la circulation sanguine. Après PEGylation, à 24h encore $\frac{1}{4}$ des nanoparticules sont toujours présentes contre aucune pour les particules non PEGylées (Blume and Cevc, 1990). Ces liposomes sont appelés liposomes furtifs. Suivant la densité d'ajout de PEG, ils adoptent une conformation « mushroom-like » (4 moles %, faible densité de PEG), ou « brush-like » quand la densité est plus importante (10 moles %) (Figure 24) (Barenholz, 2001).

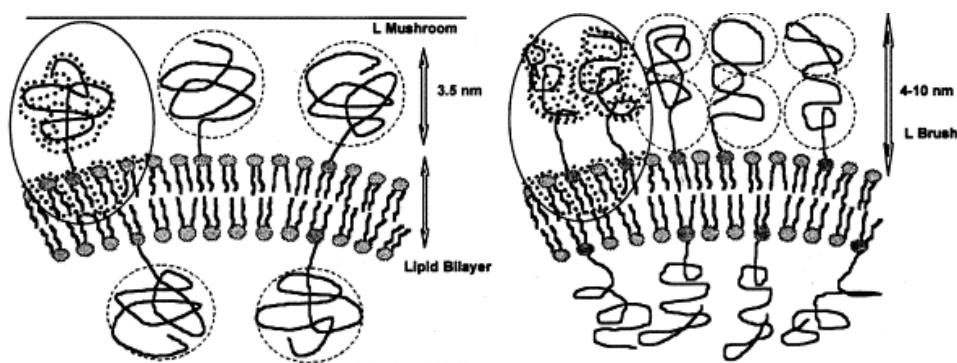


Figure 24. Les différentes conformations de PEG en fonction de leur densité dans la bicouche, à gauche : mushroom-like et à droite : brush-like (Barenholz, 2001).

Les liposomes furtifs présentent l'avantage de posséder une demi-vie plus longue dans la circulation sanguine, mais ils peuvent aussi masquer le ligand de ciblage, si celui-ci est fixé directement sur le liposome (Botosoa et al., 2011) et diminuer le trafic intracellulaire de l'ADN (Keller et al., 2003). De plus, les nanoparticules PEGylées vont créer le phénomène de la clairance sanguine accélérée (ABC). Il implique l'accumulation des particules dans le foie lorsque des injections répétées de liposomes pégylées sont effectuées sur le même animal (Ishida et al., 2005).

Le pH dans les tissus sains chez l'homme est situé autour de 7,4, mais celui du microenvironnement des tumeurs est plus acide (environ 6-6,5) en raison de l'hydrolyse de l'ATP et d'une production d'acide lactique dans les régions hypoxiques (Tannock and Rotin, 1989). Il a donc été imaginé des liposomes possédant des chaînes PEG clivables à pH acide. Chen *et. al*, ont créé le mPEG-Hz-CHEMS (mPEG-hydrazine-cholesteryl hemisuccinate) (**figure 25**), un lipide PEGylé clivable. *In vivo*, les liposomes constitués de ce lipide montre un temps de demi-vie long et échappent à une clairance sanguine accélérée (Chen et al., 2011).

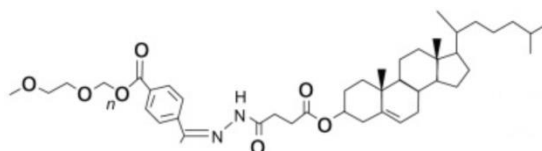


Figure 25 : Structure moléculaire du mPEG-Hz-CHEMS (Chen et al., 2012a).

La chimie des liposomes permet de les rendre furtifs, mais elle permet également de les cibler afin de les accumuler dans le tissu cible. Il est désormais possible de coupler des molécules très variées tels des immunoglobulines, des peptides, des facteurs de croissance, des sucres (**figure 26**) (Noble et al., 2014)... Dans le cancer du sein HER2 positif, des liposomes ont été couplés à un anticorps monoclonal dirigé contre ce récepteur pour permettre l'endocytose de ces liposomes de manière spécifique dans les cellules cibles. Cet immunoliposome ciblé permet d'augmenter l'effet antitumoral du traitement (Kirpotin et al., 2006).

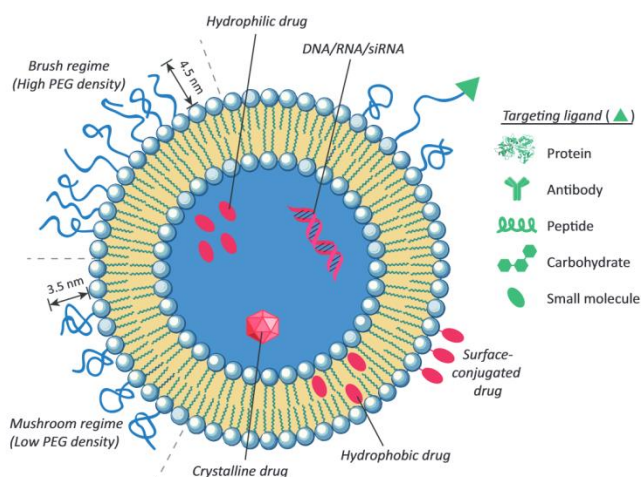


Figure 26. Représentation schématique un liposome encapsulant un médicament ou des acides nucléiques. A sa surface sont greffées différentes molécules : le PEG, ou des ligands de ciblage (protéine, anticorps, sucre...)

Le couplage de molécules ciblantes est désormais rendu plus simple. La commercialisation de lipide contenant un groupement maléimide permet de réaliser les couplages avec des ligands possédant une fonction thiol. De même, la click-chemistry autorise le greffage de nombreuses petites molécules avec de fort rendement.

Le couplage d'un ligand thiolé *via* un groupement maléimide sur les liposomes peut s'effectuer après formation des liposomes voire des lipoplexes. A pH neutre, le groupement thiol va réagir avec le groupement maléimide pour créer une liaison thioether stable (**figure 27**). L'excès du ligand peut ensuite être éliminé par dialyse des liposomes, ultrafiltration ou chromatographie selon le cas. Le Cetuximab, un anticorps contre l'EGFR commercialisé pour le traitement du cancer colorectal, a été couplé par cette technique à un liposome délivrant de l'oxaliplatine. Ceci permet une accumulation trois fois plus importante des liposomes dans le tissu cible chez la souris (Zalba et al., 2015).

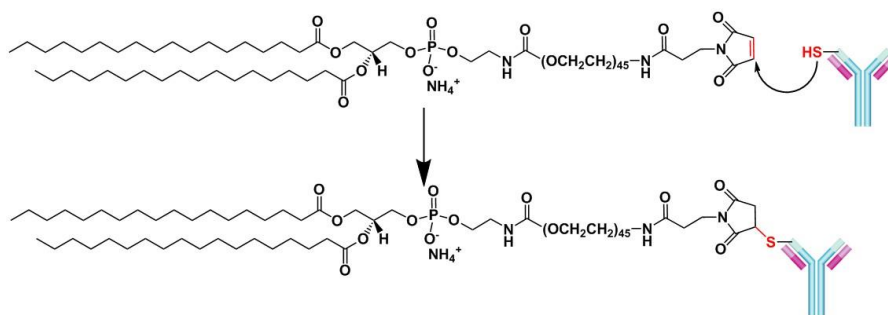
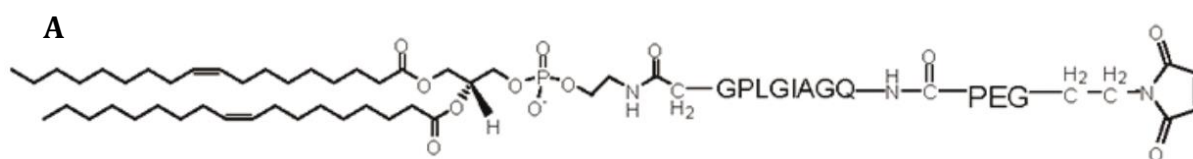


Figure 27. Exemple de réaction de couplage entre le DSPE PEG 2000 Maléimide et un anticorps thiolé (doxoxome.com).

A présent, la tendance est à développer des liposomes « intelligents » qui en plus d'être ciblé, délivreront leur contenu en réponse à un stimulus physiologique spécifique comme le pH, une enzyme surexprimée dans les tumeurs, ou un stimulus externe physique (ultrasons ou chaleur).

Les tumeurs surexpriment plusieurs enzymes dont les métalloprotéases qui sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire en vue de la migration des cellules tumorales (Kousidou et al., 2004). Zhu *et al.*, ont développé un liposome ciblé par l'anticorps mAb2C5, qui reconnaît les cellules tumorales et le peptide TAT qui permet l'internalisation des particules (Zhu et al., 2012). Après reconnaissance des cellules cancéreuses, le lipide PEGylé ciblé est clivé par MMP2, exposant ainsi le peptide TAT pour l'internalisation (**Figure 28**).



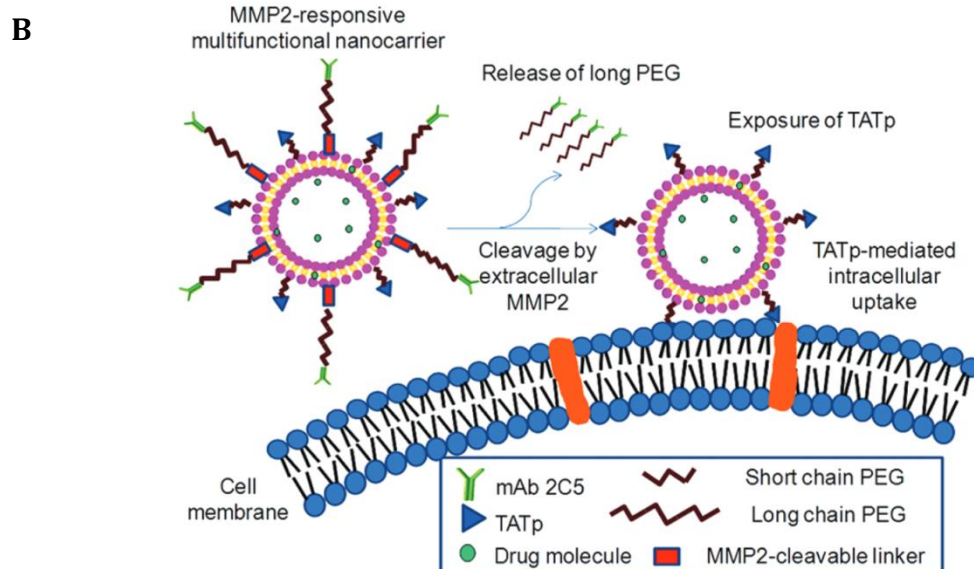
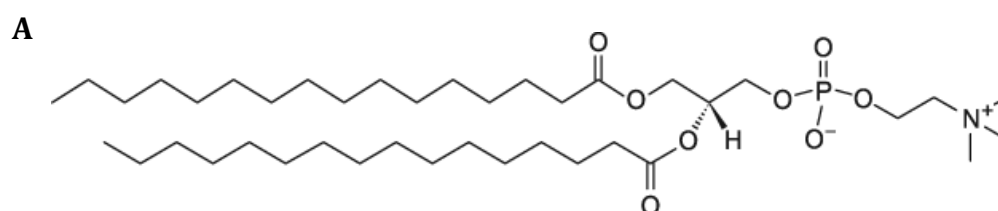


Figure 28. Schéma des nanoparticules ciblées et sensibles aux métalloprotéases MMP2.

A/ Structure du lipide sensible à MMP2, avant son couplage avec l'anticorps mAb2C5, le DOPE-peptide sensible-PEG(3400)-MAL ; B/ Fonctionnement schématique de cette nanoparticule ciblée.

Un stimulus physique comme par exemple la chaleur peut également activer les nanoparticules. Ce système a été utilisé pour la délivrance *in vivo* de doxorubicine dans des cas de tumeurs solides. La doxorubicine est encapsulée dans un liposome sensible à la chaleur. Ce liposome est composé de DPPC, de MSPC et de DSPE PEG 2000 (**figure 29**). A 40-42°C, le DPPC et le MSPC subissent une transition de phase qui va augmenter la perméabilité de la bicouche lipidique et libérer la molécule encapsulée (Lindner et al., 2004). Chez des souris porteuses de carcinomes sous cutanés, après avoir chauffé de manière locale la tumeur, l'utilisation de ces liposomes permet d'augmenter la biodisponibilité de la doxorubicine (Manzoor et al., 2012). Cette doxorubicine encapsulée dans un liposome thermosensible (ThermoDox®) a été utilisée dans un essai clinique de phase I pour le traitement du cancer du sein. Cette étude se poursuit avec le recrutement de patients pour l'essai clinique de phase II (NCT00826085).



B

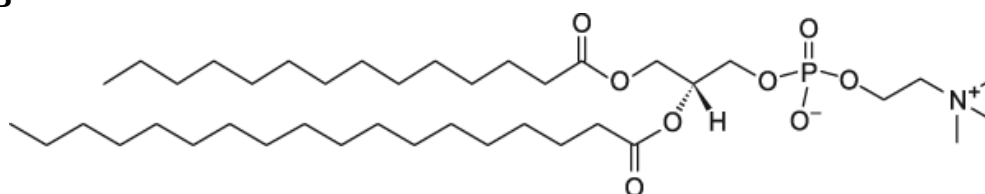


Figure 29 : Schéma des lipides DPPC (A) et MSPC (B).

Les lipides cationiques comme le DOTAP entraînent une toxicité hépatique, une inflammation pulmonaire et une sécrétion d'interféron (Lv et al., 2006). Pour les siRNA, les lipides cationiques sont utilisés en combinaison avec des lipides neutres pour diminuer leur toxicité comme le DOPE ou le DOPC.

Landen *et. al*, ont utilisés le DOPC seul afin d'encapsuler des siRNA dirigés contre l'oncogène EphA2. La délivrance de ce liposome dans un modèle de cancer ovarien développé chez la souris a permis l'inhibition de l'ARNm d'EphA2 48h après une seule injection de lipoplexes (Landen et al., 2005). Le traitement est amélioré lorsqu'ils sont délivrés en combinaison avec le paclitaxel. Un essai clinique de phase I est actuellement en cours pour le traitement des cancers avancés en utilisant des liposomes neutres (**tableau 13**).

Les lipoplexes appelés SNALP (stable nucleic acid-lipid particles) sont des formulations qui combinent des lipides cationiques, fusogènes et PEGylés qui ont une taille d'environ 120 nm, développés par Tekmira Pharmaceuticals. Chez les singes, ces liposomes ont été utilisés pour délivrer des siRNA dirigés contre l'ARNm d'ApoB (apolipoprotéine B) afin de traiter l'hypercholestérolémie (Zimmermann et al., 2006). Une dose de 2,5 mg/kg par intraveineuse permet l'extinction de 80% de l'expression de la protéine ApoB dans le foie entraînant une réduction de 65% du cholestérol sanguin. Les SNALPs ont également été utilisés pour des traitements contre l'infection à l'hépatite B (Morrissey et al., 2005), ou contre le cancer du foie (Judge et al., 2009).

Dans le traitement du cancer avec des siRNA, quatre liposomes sont entrés en phase clinique (**tableau 13**) (Xu and Wang, 2015).

Tableau 13. Essais cliniques de siRNA vectorisés par des liposomes

Nom de la nanoparticule	Cible	Voie d'administration	Cancer traité	Développement clinique	Identifiant ClinicalTrials.gov
siRNA-EphA2-DOPC EphA	EphA2 (ephrin type-A receptor 2)	Injection intraveineuse	Cancers avancés	Phase I	NCT01591356
Atu027	PKN3 (protein kinase C)	Injection intraveineuse	Tumeurs solides	Phase I	NCT00938574
TKM-080301	PLK1 (Ser/thr protein kinase 1)	Injection intra-artérielle hépatique	Cancers multiples	Phase I	NCT01437007
ALN-VSP02	KSP (kinesin spindle protein) & VEGF	Injection intraveineuse	Tumeurs solides	Phase I	NCT01158079

3. Lipopolyplexes

Les lipopolyplexes sont des complexes ternaires formés entre un acide nucléique, un polycation et des liposomes (**figure 30**). Ils sont appelés LPD, lorsqu'ils sont formés avec de l'ADN, LPR, avec de l'ARN et LPRi avec des ARN interférents (miRNA/siRNA).

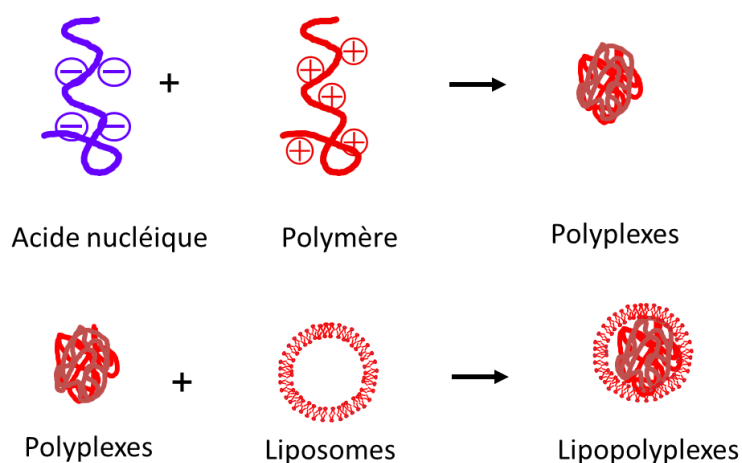


Figure 30 : Schéma de la formation de lipopolyplexes.

Les LPD ont d'abord été développés avec l'ADN par l'équipe de L. Huang en 1996. Leurs résultats montrent que l'utilisation de polymères cationiques comme la polylysine ou la protamine permet d'augmenter l'efficacité de transfection *in vitro* de plasmide ADN en présence de liposomes cationiques (Gao and Huang, 1996). Les particules formées sont plus petites et plus stables par rapport aux lipoplexes. Lorsqu'ils sont analysés par microscopie électronique, ils forment des structures globulaires et denses avec une organisation lamellaire. Dans le cas de l'ADN, les lipopolyplexes apparaissent comme des vésicules contenant en corps dense les polyplexes (**figure 31A**). Les LPR apparaissent également comme des structures globulaires avec l'encapsulation des polyplexes (**figure 31B**). Dans le cas des siRNA complexés par la PEI et des liposomes DPPC/DOTAP, les structures apparaissent plus hétérogènes et de formes polygonales. Cependant, les structures des lipopolyplexes (LPD, LPR, LPRi) sont encore assez mal définies.

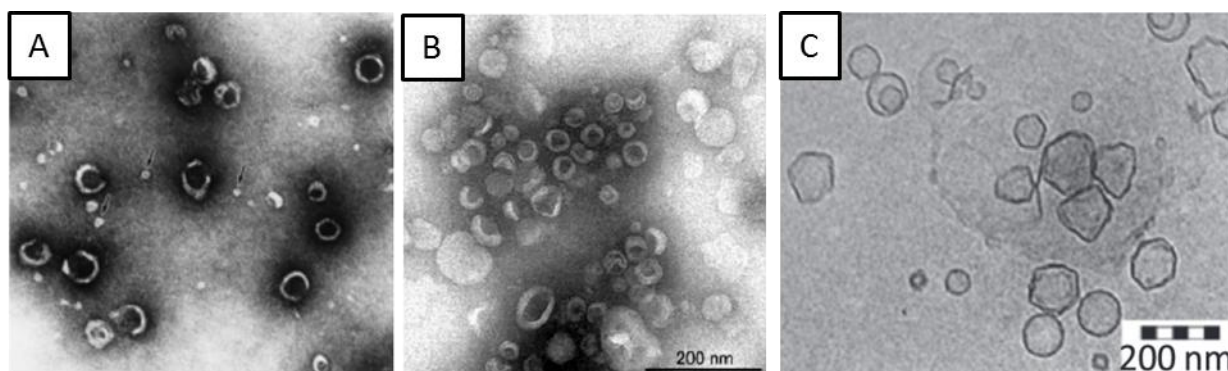


Figure 31. Microscopie électronique de lipopolyplexes.

A/ Lipopolyplexes formés avec un plasmide ADN (polylysine + liposomes DOPE/cholesteryl hemisuccinate/DOPE-polyethyleneglycol-folate) (Lee and Huang, 1996) ; B/ Lipopolyplexes formés avec de l'ARNm (polylysine PEGylée + liposomes HDHE/cholestérol) (Mockey et al., 2007), C/ Lipopolyplexes formés avec un siRNA (PEI + liposomes DPPC/DOTAP) (Ewe et al., 2014). Les images A et C sont visualisées par microscopie électronique à transmission et l'image B est visualisée par cryo-microscopie électronique.

Des LPD ont aussi été obtenus par complexation de l'ADN avec de la PEI branchée de 25 kDa puis ajout des liposomes cationiques composés de DOCSPER ou de DOSPER. Ces LPD ont une taille inférieure à 200 nm et un potentiel zêta positif (Pelisek et al., 2006). L'équipe d'E. Wagner montre que ces particules permettent l'amélioration de la transfection dans les cellules HeLa et différentes lignées de carcinome humain de colon (Sw480, Coga3, Coga5 et Coga12). Dans les cellules Sw480, les LPD permettent une expression de la luciférase 392 fois plus importante en comparaison au lipoplexe correspondant.

Au laboratoire, des lipopolyplexes (LPR) ont également été développés et utilisés pour vectoriser de l'ARNm dans le cadre d'une vaccination anti-tumorale. Des LPR ont d'abord été préparés avec des liposomes composés d'un lipide histidinylé (le L-histidine-(N,N-di-nhexadecylamine) ethylamide (HDHE) et de cholestérol (Mockey et al., 2007). Le polycation utilisé était de la polylysine partiellement histidinylée et PEGylée. Ces LPR ont montré une très bonne efficacité de vaccination contre le mélanome B16F10 chez la souris en utilisant un ARNm codant l'antigène MART-1 des mélanomes. Les polyplexes et les lipoplexes n'ont pas permis d'obtenir une vaccination montrant ainsi l'intérêt des formulations de LPR. Au cours de cette étude, il a été montré que cette formulation permet l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique *via* des lymphocytes T CD8+.

Ces LPR ont ensuite été formulés avec des liposomes comprenant des lipides bioinspirés: le O,O-dioleyle-N-[3N-(N-methylimidazoliumiodide)propylene] phosphoramidate (KLN25) et le O,Odioleyle-N-histamine phosphoramidate (MM27) (**figure 32**) (Mével et al., 2008a, 2008b). Le MM27 possède un noyau imidazole protonable en milieu acide favorisant une fusion membranaire permettant l'échappement endosomal à pH acide. Ces LPR (LPR100) contenant l'ARNm de MART1 utilisés dans le même modèle du mélanome B16F10 ont permis d'obtenir une protection contre la progression des tumeurs B16F10 (Perche et al., 2011a).

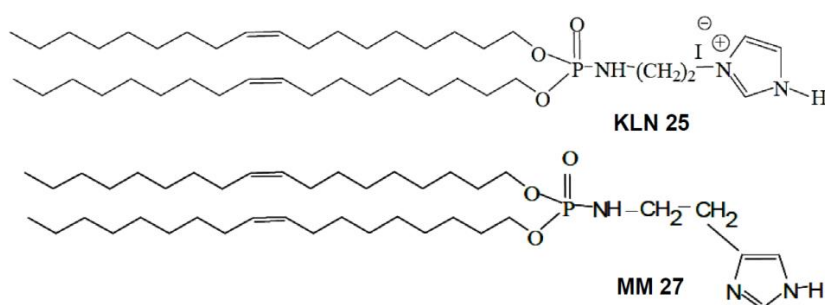


Figure 32. Structure des lipides utilisés, le KLN25 et le MM27 (Mével et al., 2008a).

Par la suite, les LPR ont été ciblés en incorporant un lipide mannosylé afin d'améliorer leur internalisation *via* le récepteur mannose dans les cellules dendritiques. Les LPR mannosylés ont montré une meilleur efficacité à transfecter les cellules dendritiques de la rate des souris après injection intraveineuse et ont permis d'obtenir un effet vaccin plus important par rapport au LPR100 non ciblés (**figure 33**) (Perche et al., 2011a).

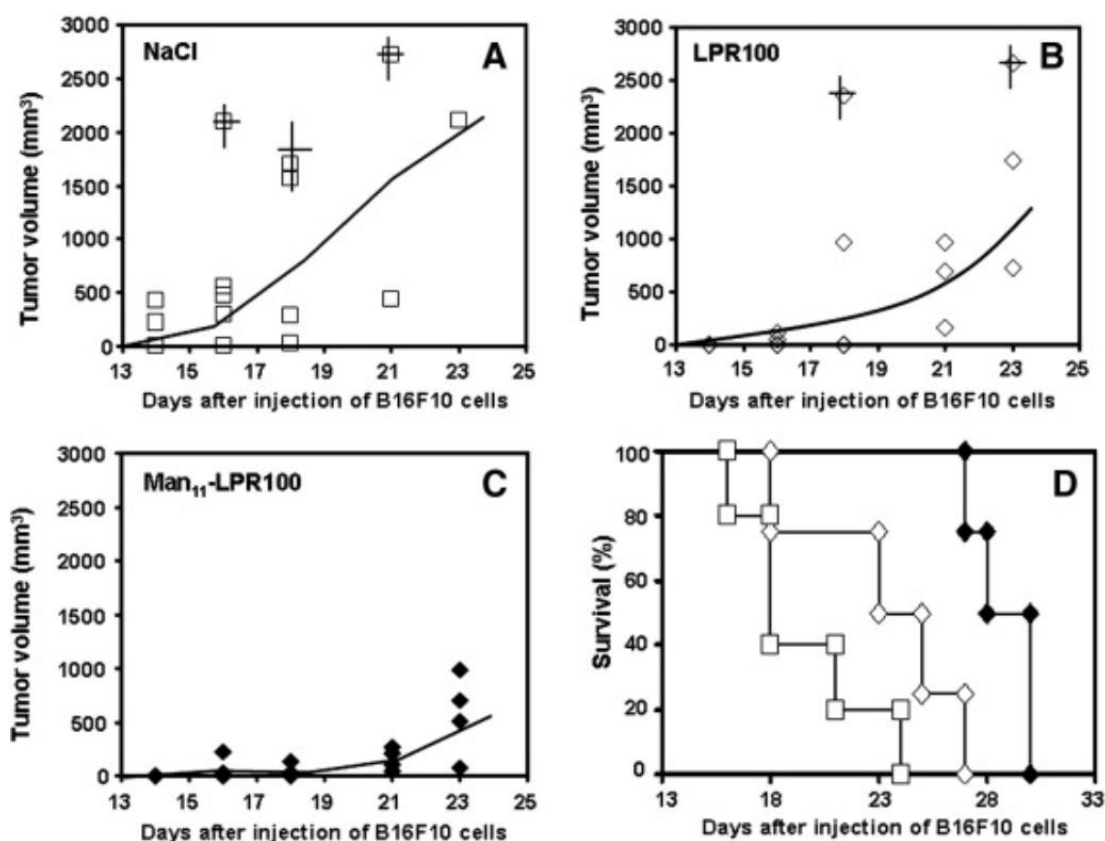


Figure 33. Mesure du volume tumoral des souris.

(A) sans vaccination (NaCl) ou après vaccination par les LPR 100 (non ciblés) (B) et par les LPR 100 mannosylés (C). Courbes de survie des trois groupes de souris traitées (D) (Perche et al., 2011a).

L'équipe de L. Huang a développé des nanoparticules composées de siRNA, de protamine et de liposomes DOTAP ou DSAA (**figure 34**) (Chen et al., 2010). Ces LPRi sont munis d'une petite molécule, l'anisamide pour réaliser un ciblage *via* le récepteur sigma surexprimé par les cellules du mélanome B16F10.

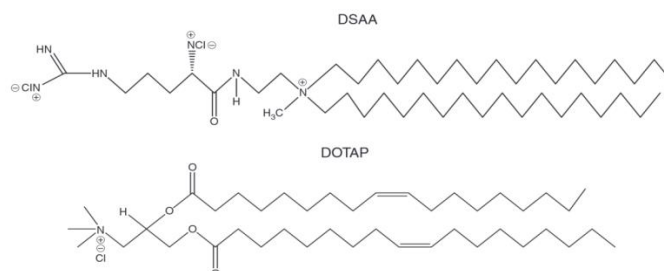


Figure 34. Structure des lipides cationiques utilisés pour former les LPRi (Chen et al., 2010).

Les LPRi avec des siRNA anti-luciférase formulés avec le DSAA, permettent l'inhibition de la luciférase de 90% dans les cellules B16F10 *in vitro* et les images de

microscopie confocale montrent les siRNA fluorescents présents dans le cytoplasme de ces mêmes cellules. *In vivo*, les LPri ont été utilisés pour délivrer des siRNA anti-cMyc, un oncogène, ainsi que du paclitaxel, dans un modèle de tumeur B16F10 greffé en sous-cutané chez la souris. Ces LPri, contenant le paclitaxel et différentes doses de siRNA (0,3 mg/kg ou 1,2 mg/kg) sont délivrés dans la circulation sanguine. Les résultats montrent que l'injection d'1,2mg/kg de siRNA c-myc formulés avec le paclitaxel permet de diminuer significativement la taille de la tumeur (20 mm² contre 140 mm² pour les souris PBS) (**figure 35**). Un effet beaucoup plus faible est obtenu avec les LPri sans paclitaxel. Les résultats montrent l'intérêt de combiner différentes molécules pour inhiber la croissance tumorale.

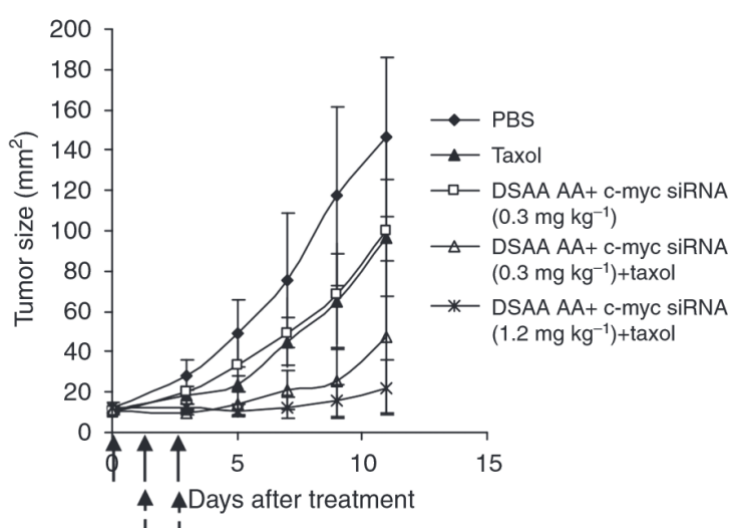


Figure 35. Mesure de la taille tumorale des souris après traitement par les LPri (Chen et al., 2010).

Il existe encore d'autres exemples d'utilisation de lipopolyplexes pour la vectorisation d'acides nucléiques. Une liste non exhaustive est présentée en **tableau 14**.

Tableau 14. Quelques autres exemples de lipopolyplexes utilisés comme vecteur de thérapie génique

Type d'acide nucléique	Acide nucléique	Polycation	Liposome	Ciblage	Cellules cibles	Ref.
ARNi	miR-29b	PEI	DOPE/Linoleic acid/DMG-PEG	Transferrine	Cellules de leucémie aiguë myéloblastique	(Huang et al., 2013)
	siRNA anti luciférase	PEI	DOTAP/DPPC	/	Cellules cancéreuses ovariennes	(Ewe et al., 2014)
	siRNA anti VE cadhérine	Protamine	SAINT/DOPE	IgG anti-sélectine E	Cellules endothéliales	(Kowalski et al., 2015)
	ARNm MART1	PEG-HpK	HDHE/Cholesterol	/	Cellules dendritiques	(Mockey et al., 2007)
ARNm	ARNm MART1	PEG-HpK	KLN25/MM27	Mannose	Cellules dendritiques	(Perche et al., 2011a)
ADN	Plasmide IL-12	PEI	DOTAP/Cholesterol	Acide folique	HeLa, B16F10	(Urbiola et al., 2013)
	Plasmide VEGF	PEI	(Lys/Arg/His)-Chol/DOPE	/	Cellules souches mésenchymateuses	(Song et al., 2012)
	Plasmide luciférase	Peptide polycationique	DOTMA/DOPE	/	A549 adénocarcinome pulmonaire	(Welser et al., 2013)
	Oligonucléotide antisens Bcl-2	Protamine	DC-Chol/egg PC/ DSPE-PEG	Transferrine	Cellules de leucémie aiguë myéloblastique	(Koh et al., 2010)

C. Les barrières à la délivrance d'acides nucléiques

Les nombreuses modifications chimiques apportées sur les vecteurs (furtivité, ciblage) tendent à répondre aux nombreuses barrières qui s'opposent à la délivrance des acides nucléiques dans les cellules cibles et dans le bon compartiment intracellulaire. Les formulations doivent être stables dans la circulation sanguine et ceci durant un certain temps, puis doivent favoriser la reconnaissance et la pénétration dans les cellules cibles pour enfin délivrer et libérer l'acide nucléique (**figure 36**). Les deux aspects abordés ici sont les barrières extracellulaires et les barrières intracellulaires à la délivrance d'acides nucléiques.

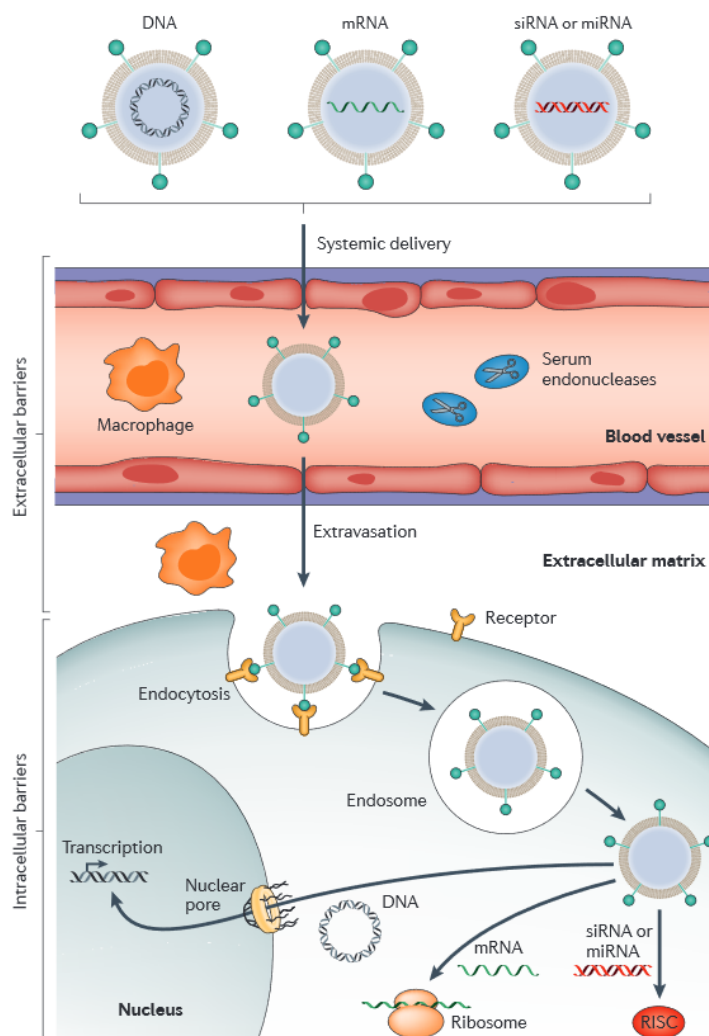


Figure 36. Schéma des différentes barrières à la délivrance de vecteur non viral (Yin et al., 2014).

1. Les barrières extracellulaires

Lorsque le traitement s'effectue par voie systémique, les formulations se trouvent dans la circulation sanguine et doivent être capables d'atteindre les cellules d'intérêt. Dans la circulation sanguine, le temps de demie-vie d'un plasmide ADN nu est estimé à une dizaine de minutes (Kawabata et al., 1995) et celui d'un siRNA nu à 6 minutes (Soutschek et al., 2004). De plus, les petits acides nucléiques comme les siRNA (masse moléculaire moyenne : 13,5 kDa), lorsqu'ils ne sont pas vectorisés sont soumis à la filtration glomérulaire rénale. Cette filtration laisse passer les ions et les protéines d'une taille inférieure à 70kDa, les siRNA nus sont donc filtrés (Yin et al., 2014). Le système de vectorisation est donc crucial pour la protection et l'acheminement de l'acide nucléique. En plus du vecteur, les siRNA peuvent être modifiés chimiquement afin d'augmenter la stabilité.

Les modifications courantes sont effectuées sur le squelette phosphodiester ou sur les sucres (**figure 37**). Sur le squelette phosphodiester, la modification la plus fréquente est le remplacement de l'oxygène par un atome de soufre pour créer un groupe phosphorothioate qui rend l'acide nucléique résistant à l'action des nucléases comme la RNase H. Cette modification est facilement réalisable chimiquement, elle n'altère pas la fonction du siRNA mais peut entraîner une augmentation de la toxicité (Harborth et al., 2003).

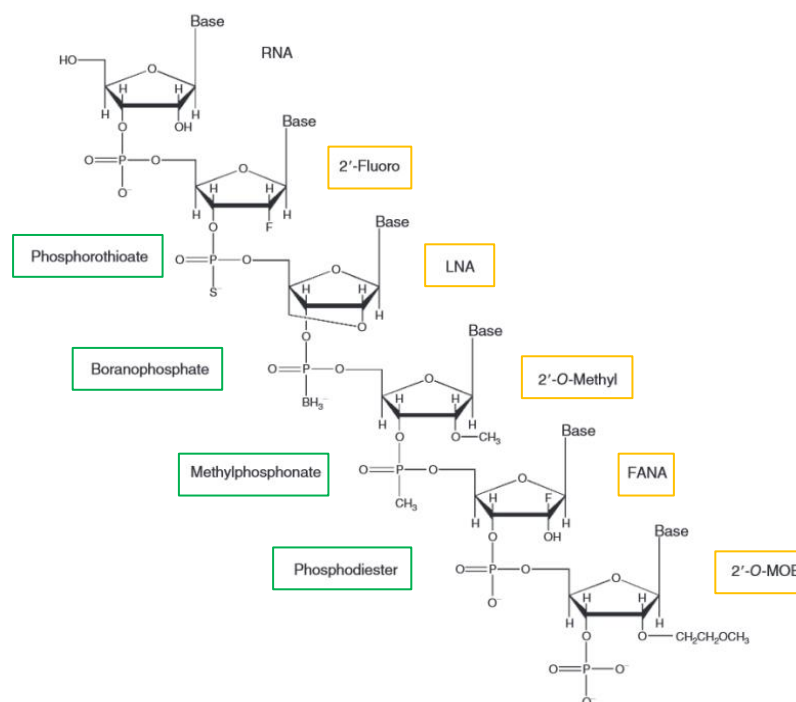


Figure 37. Quelques modifications possibles des bases de l'ARN (Behlke, 2008).

La modification du sucre la plus fréquemment réalisée est la méthylation du 2'OH. En effet, ce groupe n'est pas nécessaire à l'activité du siRNA (Chiu and Rana, 2003). Cette modification peut se faire sur la totalité du duplexe et va augmenter sa stabilité face aux nucléases. Cependant cette modification sur la totalité du brin est controversée, certains affirmant qu'elle modifie l'activité du siRNA (Czauderna et al., 2003) et d'autres non (Choung et al., 2006).

Les LNA (Locked Nucleic Acid) sont des ARN modifiés sur le ribose (Koshkin et al., 1998). Une liaison est créée entre l'atome d'oxygène en 2' et le carbone en 4'. Ceci bloque le sucre dans une conformation C3'-endo, permettant une résistance accrue aux nucléases. Cette modification au niveau des siRNA peut résulter en une baisse de leur activité si elle est réalisée sur le brin antisens (Elmén et al., 2005).

La modification FANA (2'-fluoro-β-D-arabinonucleotide) consiste à remplacer l'hydrogène situé en 2' du ribose par un fluor. Elle permet d'augmenter la stabilité du brin mais diminue également son activité si elle est réalisée sur le brin antisens (Dowler et al., 2006).

Lorsque l'acide nucléique est complexé dans un vecteur cationique, il peut être reconnu par le système réticuloendothélial (RES) (Scherphof et al., 1985). Comme mentionné précédemment, les charges positives présentes à la surface des nanoparticules vont entraîner des interactions avec des protéines du sérum. Les nanoparticules sont ensuite phagocytées par les macrophages dans le foie, les reins et la rate. Afin d'échapper au RES, les nanoparticules sont rendues furtives, par l'ajout de PEG par exemple. Ceci permet d'augmenter le temps de demi-vie jusqu'à plus de 40h pour une nanoparticule PEGylée, qui se distribuera dans tout l'organisme. Environ 10 à 15% sera retrouvée dans le foie alors que sans la PEGylation 80 à 90% est retrouvée dans le foie (Maruyama, 2011).

La taille des particules est également un paramètre crucial. Par exemple, si la taille du liposome est supérieure à 400 nm il sera immédiatement pris en charge par le système RES et éliminé par la rate, alors qu'un liposome de 200 nm aura un temps de circulation plus conséquent (Liu et al., 1992; Maruyama et al., 1992). Ce paramètre va être très important pour l'extravasation et la pénétration dans le tissu d'intérêt. Dans les tissus normaux, les vaisseaux sanguins sont composés de cellules endothéliales avec des jonctions serrées, aussi les nanoparticules ne peuvent traverser. En revanche, la vascularisation tumorale est très différente, les jonctions entre les cellules endothéliales sont plus lâches ce qui permet l'extravasation des particules. Ce phénomène est appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) (**figure 38**).

Lorsque la tumeur se développe, différents signaux néoangiogéniques sont émis. Ces signaux permettent de créer de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'alimenter la tumeur en oxygène et en nutriments (Kobayashi et al., 2014). Ces nouveaux vaisseaux sont créés de manière anarchique et ne suivent pas l'architecture d'une vascularisation normale. La vascularisation des tumeurs est par conséquent hétérogène puisque les vaisseaux sanguins ne sont pas également répartis et de plus ils sont plus perméables du fait que les cellules endothéliales sont mal organisées. Ce phénomène va permettre aux nanoparticules de traverser de manière passive la vascularisation tumorale. Dans un modèle de tumeur greffée sur des souris, il a été trouvé que les vaisseaux sont perméables à des particules de 400 nm (Yuan et al., 1995). Par ailleurs, le drainage lymphatique de la tumeur est presque inexistant (Maeda, 2010), ce qui permet aux nanoparticules d'être piégées à l'intérieur de la tumeur (Maruyama, 2011).

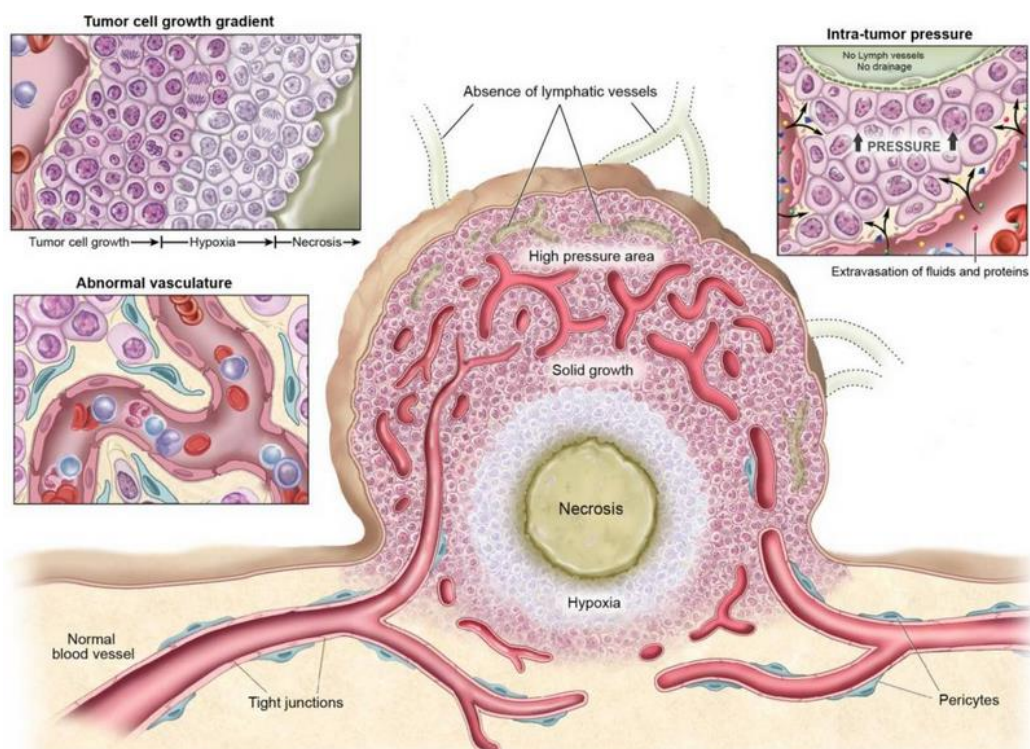


Figure 38. Illustration de l'effet EPR: mauvaise organisation des cellules endothéliales, drainage lymphatique absent et pression sanguine plus élevée (Kobayashi et al., 2014).

Il est possible de tirer profit de cet effet EPR pour la délivrance de molécules thérapeutiques. Des équipes ont tenté d'augmenter artificiellement cet effet afin d'améliorer l'accumulation de la molécule délivrée dans la tumeur. Dans une étude clinique, Nagamitsu *et al.*, ont induit une hypertension par perfusion d'angiotensine chez des patients souffrants de tumeurs solides avancées. Cette hypertension induite durant 20 min provoque un flux sanguin plus important dans les tumeurs et augmente la délivrance de la molécule anticancéreuse SMANCS (Nagamitsu et al., 2009).

Certains organes sont très difficiles d'accès pour les nanoparticules, parmi lesquels les poumons. L'anatomie de cet organe est complexe de par son architecture réticulée et la présence d'une barrière biologique importante : le mucus (**figure 39**). Les poumons sont sujets à des phénomènes de clairance, la clairance muco-ciliaire et la toux, tous deux empêchant l'obstruction et les infections (Birchall, 2007). Le mucus tapisse l'épithélium respiratoire de la trachée aux bronchioles. Il permet de capturer les impuretés inhalées et les transporte jusqu'à l'œsophage. L'épaisseur de mucus est très variable et peut atteindre jusqu'à 260 μm (Widdicombe, 1997). Le mucus contient 95% d'eau et est composé de

divers types de protéines parmi lesquelles les protéases et les mucines. Ces dernières sont des protéines glycosylées et négativement chargées, qui sont liées entre elles, assurant la propriété de viscoélasticité (Sanders et al., 2009). Quant aux alvéoles, elles sont recouvertes de surfactant composé à 90% de lipides et de 10% de protéines (Goerke, 1998). L'architecture pulmonaire cumulée à la présence de mucus et de surfactant sont des barrières très importantes à la délivrance des nanoparticules.

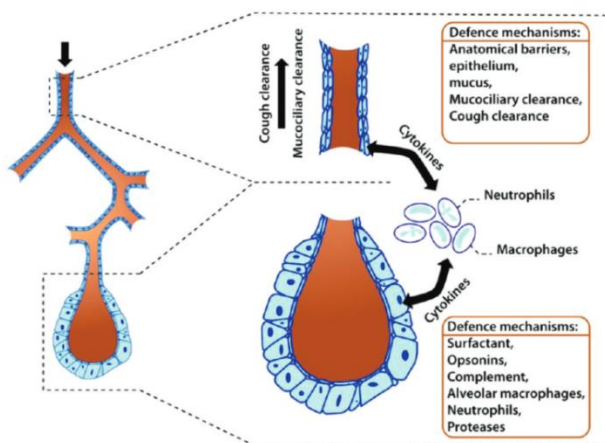


Figure 39. Barrières à la délivrance de gènes dans les poumons (Merkel et al., 2009).

Pour le poumon, différentes délivrances locales sont utilisables : l'instillation intranasale, l'injection intratrachéale, l'injection endotrachéale (Microsprayer®, Aeroprobe nebulizing catheter) et la nébulisation (Micro-mist nebulizer). Une étude comparative entre la délivrance de liposome (DOTAP) contenant des siRNA, de la doxorubicine ou des oligonucléotides antisens par injection systémique ou locale (injection endotrachéale) montrent que ces trois molécules sont trouvées en plus grande quantité dans les poumons par la délivrance endotrachéale (Garbuzenko et al., 2009). Cependant pour l'homme, la délivrance endotrachéale n'est pas réalisable et la seule délivrance locale applicable reste la nébulisation.

2. Les barrières intracellulaires

a) Les différentes voies d'endocytose

Une fois que la formulation a pu atteindre sa cible cellulaire, elle doit entrer dans la cellule. Cette entrée peut se faire de manière passive ou de manière active *via* des récepteurs qui vont déclencher l'endocytose (**figure 40**) (Chou et al., 2011).

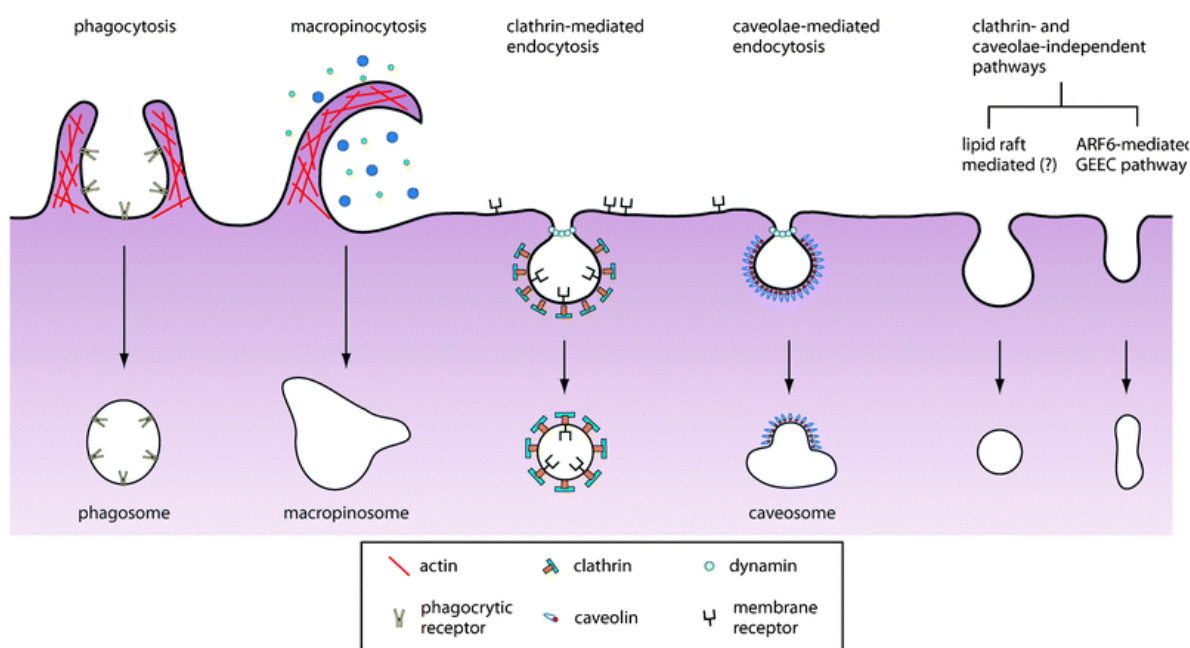


Figure 40. Différentes voies d'endocytose des cellules eucaryotes (Chou et al., 2011).

L'endocytose est un mécanisme cellulaire procédant à l'internalisation de macromolécules situées dans le milieu extracellulaire. Elle s'effectue principalement par l'intermédiaire de cinq mécanismes : la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose cavéoline-dépendante et l'endocytose clathrine/cavéoline indépendante.

Les nanoparticules utilisent ces différentes voies d'endocytose pour pénétrer dans les cellules. Les mécanismes impliqués dans le choix de la voie sont méconnus. Ils dépendent du type cellulaire mais également de la taille, la charge, et la forme des nanoparticules (Kou et al., 2013).

La phagocytose concerne l'internalisation des particules larges ($> 1\mu\text{m}$) et permet la digestion de débris cellulaires *via* la formation d'un phagosome qui va fusionner avec les lysosomes où son contenu sera dégradé.

La macropinocytose permet l'endocytose de fluide extracellulaire et de protéines par l'intermédiaire d'un renflement de la membrane cellulaire.

L'endocytose clathrine-dépendante est le mécanisme d'endocytose le plus décrit dans la littérature (**figure 41**). Il s'agit d'une endocytose récepteur-dépendante qui s'effectue en plusieurs étapes : en premier lieu, une macromolécule se lie à son récepteur membranaire, ce qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice AP2 à la membrane plasmique à laquelle va se lier la clathrine. La polymérisation de la clathrine forme des triskélions, entraine la création de la vésicule par invagination de la membrane plasmique. La vésicule de 100 nm se détache de la membrane plasmique par l'hydrolyse du GTP par la dynamine. Une fois à l'intérieur de la cellule, la vésicule se débarrasse de son manteau de clathrine et fusionne avec un endosome précoce (McMahon and Boucrot, 2011).

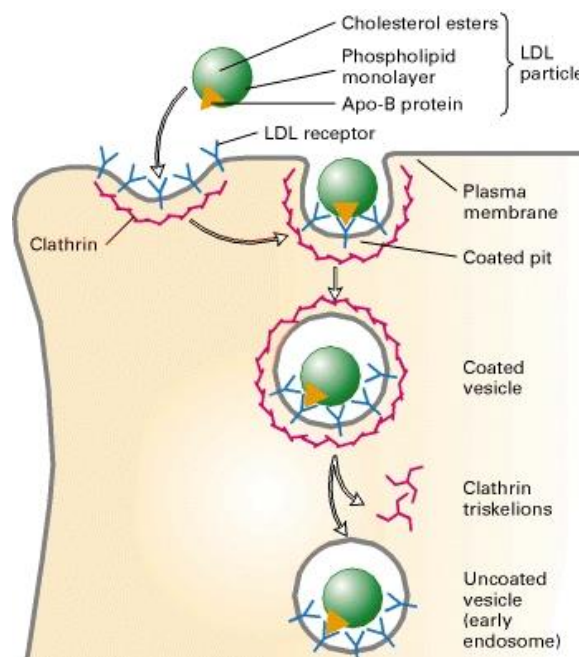


Figure 41. Endocytose clathrine-dépendante (Chou et al., 2011).

Certaines macromolécules ou molécules naturelles sont connues pour induire une endocytose *via* la voie clathrine après liaison à un récepteur spécifique. Cette particularité a

été exploitée afin d'améliorer l'endocytose des nanoparticules. Par exemple, le récepteur à la transferrine est connu pour être surexprimé à la surface de certaines cellules cancéreuses. Des liposomes ciblés par la transferrine ont permis d'augmenter l'internalisation dans les cellules tumorales (Qin et al., 2014; Yuan et al., 2015). D'autres récepteurs tels que le récepteur mannose sur les macrophages et les cellules dendritiques et le récepteur galactose sur les hépatocytes induisent l'endocytose clathrine-dépendante de macromolécules possédant des groupes mannose ou galactose.

De même, le récepteur HER2 surexprimé dans 25% des cancers du sein est souvent ciblé. Des liposomes contenant de la doxorubicine, ciblés par un anticorps dirigé contre ce récepteur augmente l'endocytose des particules spécifiquement dans les cellules tumorales et améliore le traitement (Geretti et al., 2015; Li et al., 2015; Reynolds et al., 2012).

L'endocytose cavéoline-dépendante permet la formation de vésicule d'environ 80 nm par invagination de la membrane plasmique dans des régions riches en cholestérol ou radeaux lipidiques. Les vésicules formées sont recouverte de cavéoline-1, petite protéine de 21 kDa. Les vésicules formées fusionnent ensuite avec les endosomes précoces. Cette endocytose est impliquée dans le transport du cholestérol et la signalisation calcique (Ziello et al., 2010).

Un exemple d'endocytose clathrine/cavéoline indépendante est celui de l'endocytose de l'acide folique *via* le récepteur de l'acide folique (FR) qui est surexprimé dans plusieurs cancers tels que le cancer du sein et de l'ovaire. L'endocytose dépend de la protéine cdc-42 (Kou et al., 2013). Le FR est une protéine ancrée dans la membrane par un GPI (glycosylphosphatidylinositol) qui possède une affinité pour son ligand de l'ordre de 10^{-9} M. Il existe 4 isoformes de ce récepteur : α , β , γ , et δ qui ont pour but de capter l'acide folique pour le faire pénétrer dans les cellules (Matherly and Goldman, 2003). L'acide folique a un rôle majeur dans les cellules puisqu'il est le précurseur d'une enzyme, le tétrahydrofolate, impliqué dans la biosynthèse des nucléotides et de certains acides aminés. L'endocytose de l'acide folique permet son transport jusqu'aux endosomes, puis le récepteur est recyclé à la membrane plasmique (**figure 42**). Le contenu de la vésicule n'ira pas jusqu'aux lysosomes, il ne sera pas dégradé mais libéré dans le milieu intracellulaire (Low and Antony, 2004). Cette particularité est exploitée pour l'endocytose de nanoparticules. Dans le cancer du sein, c'est le FR α qui est souvent surexprimé à cause de différents facteurs : augmentation de la transcription (Antony et al., 2004), variation de la

concentration d'acide folique dans le milieu extracellulaire (Kane et al., 1988), mutations (Zhang et al., 2005), ou régulation par les œstrogènes (Kelley et al., 2003).

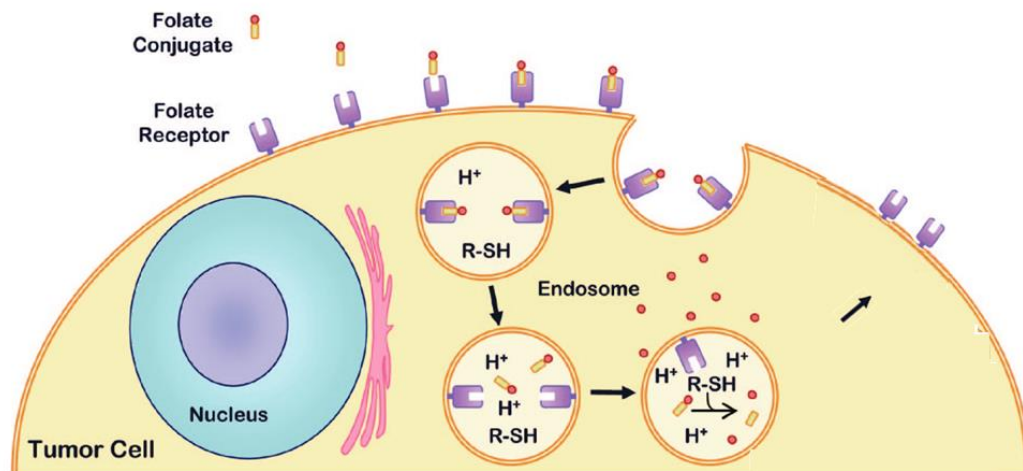


Figure 42. Internalisation de l'acide folique dans la cellule cancéreuse.

La surexpression de ce récepteur et le coût peu excessif de l'acide folique en font un couple souvent utilisé pour le ciblage d'agents thérapeutiques dans les cellules cancéreuses du sein et d'agents de contrastes et radioéléments en imagerie par le folate. Une liste non exhaustive de quelques vecteurs est présentée dans le **tableau 16**.

Tableau 16. Liste de quelques nanoparticules ciblées par le folate.

Utilisation	Nanoparticule	Molécule vectorisée	Cellules cibles	Ref.
Thérapeutique	Liposome: DSPC/Chol/DSPE PEG2000-Folate	Doxorubicine	KB (Carcinome humain du col utérin)	(Riviere et al., 2011)
	Liposome : Chol/PEG-folate	Doxorubicine/siRNA	HeLa/KB	(Yang et al., 2014)
	siRNA conjugué au folate	siRNA	KB	(Dohmen et al., 2012)
	Polymère : Chitosan-folate	ADN	OV2008 (Cancer humain ovarien) & MCF-7 (Cancer humain mammaire)	(Lee et al., 2006)
	Polymère : Cyclodextrine-folate	ADN	HeLa	(Aranda et al., 2013)
Imagerie	/	¹¹¹ In-DTPA-folate	KB	(Mathias et al., 1998)
	/	[^{99m} Tc]DTPA-folate	KB	(Mathias et al., 2000)
	Liposome Gd.DOTA.DSA/DOPC/Chol/DSPE PEG2000/DSPE PEG2000-Folate/DOPE-Rhodamine	/	IGROV-1 (Carcinome humain ovarien)	(Kamaly et al., 2009)

Les nanoparticules sont prises en charge par ces différentes voies. Ceci va dépendre du type de complexe ainsi que du type cellulaire. En effet, la taille des complexes sera prise en compte, ainsi que la charge des nanoparticules générant plus ou moins d'interactions avec la membrane cellulaire. La plupart des lipoplexes vont être pris en charge par la voie clathrine-dépendante mais peuvent également entrer *via* la voie des cavéolines (Pichon et al., 2010).

Billiet *et. al* ont effectué des études comparatives entre le trafic intracellulaire des polyplexes, des lipoplexes et des lipopolyplexes dans la lignée de myoblastes C2C12 (Billiet et al., 2012). Ces vecteurs sont formulés à base de PEI ou de polylysine tous deux histidylés et de liposomes cationiques. Dans cette lignée cellulaire, l'étude montre que les lipopolyplexes sont entrés par la voie cavéoline-dépendante comme les lipoplexes alors que les polyplexes sont entrés par la voie clathrine-dépendante. De même, Breuzard *et. al*, ont montré que l'endocytose des polyplexes dépendait principalement du polymère employé et du type cellulaire. Ceux-ci peuvent entrer à la fois par la voie clathrine-dépendante et indépendante et ceci dans la même cellule (Midoux et al., 2008).

b) Activation du système immunitaire dans les endosomes par les petits ARN

Après endocytose, les acides nucléiques vectorisés arrivent dans les endosomes. Ceux-ci peuvent contenir des TLR (Toll-like receptors) présents afin de lutter contre les infections virales *via* reconnaissance de ces acides nucléiques (**figure 43**). Après identification de l'acide nucléique étranger, celui-ci est dégradé et une réponse inflammatoire est initiée avec synthèse d'interféron, de TNF- α et d'IL-6 (Jackson and Linsley, 2010). Chez l'homme, la famille des TLR est composée de dix membres parmi lesquels les TLR3, les TLR7/8 et les TLR9 qui reconnaissent respectivement les dsRNA, les ssRNA et l'ADN bactérien riche en motifs CpG. Concernant les siRNA, cette reconnaissance est fondée sur leur structure (Jackson and Linsley, 2010). La longueur du siRNA va aussi entrer en compte : des siRNA de 19 nucléotides ou plus contenant le motif immunostimulant (GUCCUCAA) vont induire une production de cytokine (Judge et al., 2005). En revanche, des siRNA de 12 et 16 nucléotides ne déclencheront pas de production de cytokine (Hornung et al., 2005).

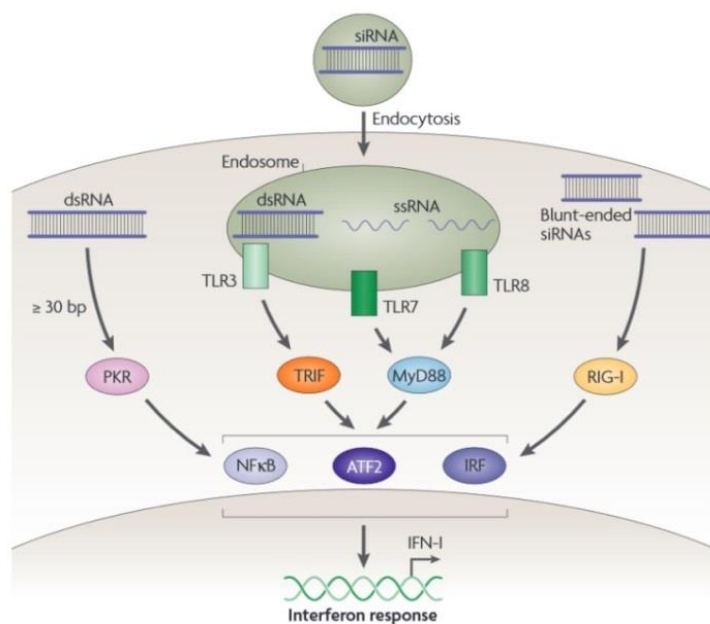


Figure 43. Différentes voies du système immunitaire activées par les doubles-brins d'ARN (Kim and Rossi, 2007).

Les solutions pour éviter cette activation des TLR sont peu nombreuses, elles consistent en l'élimination de motifs immunostimulants dans les séquences, mais ceux-ci restent peu identifiés (Judge et al., 2005). Comme mentionné précédemment, les modifications chimiques des siRNA peuvent améliorer leur stabilité envers les nucléases. Judge *et. al* montrent que la substitution de 5% des 2'OH-uridine par des 2'Omethyl sur l'uridine, la guanosine et l'adénosine permet de diminuer de manière significative la réponse immune (Judge et al., 2006).

c) L'échappement endosomal

Les différentes voies d'endocytose présentées précédemment mènent toutes dans les endosomes précoces. Selon le type de récepteurs et de macromolécules ou particules, celles-ci peuvent être ensuite délivrées dans les endosomes tardifs et enfin, dans les lysosomes. Une particularité des vésicules d'endocytose telles que les endosomes précoces et tardifs, est que le pH de leur lumière s'acidifie progressivement grâce à une ATPase à protons qui concentrent les protons à l'intérieur de ces vésicules. Cette accumulation des protons commence dès la formation des vésicules à clathrine dans le cas de l'endocytose clathrine-dépendante. Les autres voies d'endocytose (cavéoles, macropinosomes) sauf les

phagosomes ne sont pas acides mais le deviennent lorsqu'elles fusionnent avec les endosomes précoces. Les endosomes tardifs fusionnent ensuite avec les lysosomes où se trouvent des enzymes dont des protéases et des nucléases. Il est donc primordial pour les acides nucléiques de s'échapper des endosomes avant d'être délivrés dans les lysosomes où ils seront irrémédiablement dégradés. Des solutions afin d'augmenter cet échappement endosomal ont été identifiées et développées, notamment l'utilisation de lipides fusogènes et de polymère protonables en milieu acide.

Lors de l'endocytose des lipoplexes, les lipides cationiques des liposomes peuvent interagir avec les lipides anioniques de la membrane endosomale par des interactions électrostatiques. Par un mécanisme de flip-flop des lipides, proposé par l'équipe de F. Szoka en 1996 (Xu and Szoka, 1996; Zelphati and Szoka, 1996a, 1996b). Un échange de lipide se produit suite à ces interactions et permet le transfert de l'acide nucléique dans le milieu intracellulaire (**figure 44**).

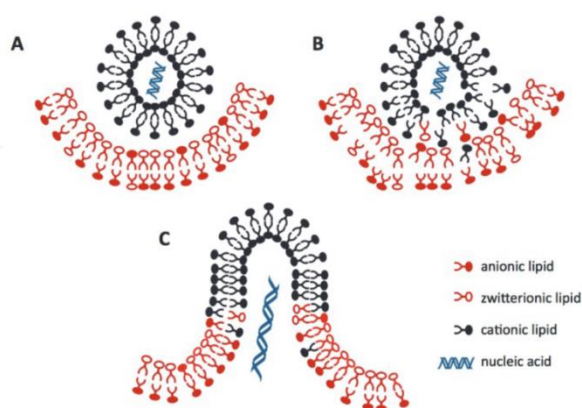


Figure 44. Interaction des lipides entre les lipoplexes et les endosomes.

A/ Le lipoplexe est dans l'endosome. B/ Des interactions électrostatiques se créent entre les lipides cationiques et les anioniques. C/ Flip-flop des lipides et libération de l'acide nucléique.

L'utilisation de co-lipides fusogènes comme le DOPE permet d'augmenter l'échappement endosomal. Lors de l'acidification de l'endosome, ces lipides vont capter les protons H^+ ce qui induit un changement de phase notamment lamellaire vers hexagonal dans leur bicouche lipidique permettant une meilleure fusion avec la membrane des endosomes (Zhou and Huang, 1994; Zuhorn et al., 2005). Ceci induit la libération de l'acide nucléique hors de l'endosome. L'utilisation de lipides avec une tête polaire imidazole protonable en milieu acide induit une amélioration de l'échappement endosomal par effet éponge à protons (Midoux et al., 2009).

Concernant les polyplexes, c'est l'hypothèse de l'éponge à protons qui est retenue pour l'échappement endosomal (Boussif et al., 1995). Ce phénomène a été proposé en 1995 pour la PEI. Ce mécanisme se produit avec des polymères cationiques possédant des groupes amines secondaires et tertiaires ayant un pKa acide. En effet, ces groupements vont capter les protons générés dans les endosomes ou lysosomes. Cependant, les pompes H⁺-ATPase toujours actives font entrer des ions H⁺ pour maintenir un pH acide dans l'endosome. Cette entrée d'H⁺ est accompagnée d'entrée passive d'ions Cl⁻ ce qui induit un afflux d'eau. Tous ces événements conduisent à la déstabilisation de la membrane de la vésicule, induisant la libération des acides nucléiques dans le cytosol de la cellule (**figure 45**).

D'autres molécules possédant des groupes protonables en milieu acide ont été employées. C'est le cas de l'histidine ou l'imidazole qui ont un pKa proche de 6.0. Greffées sur différents polymères cationiques, notamment sur la PEI et la polylysine, elles améliorent l'effet éponge à protons, augmentent la transfection et diminuent nettement la cytotoxicité des polymères cationiques utilisés (Bertrand et al., 2011; Gomez et al., 2013; Midoux et al., 2009).

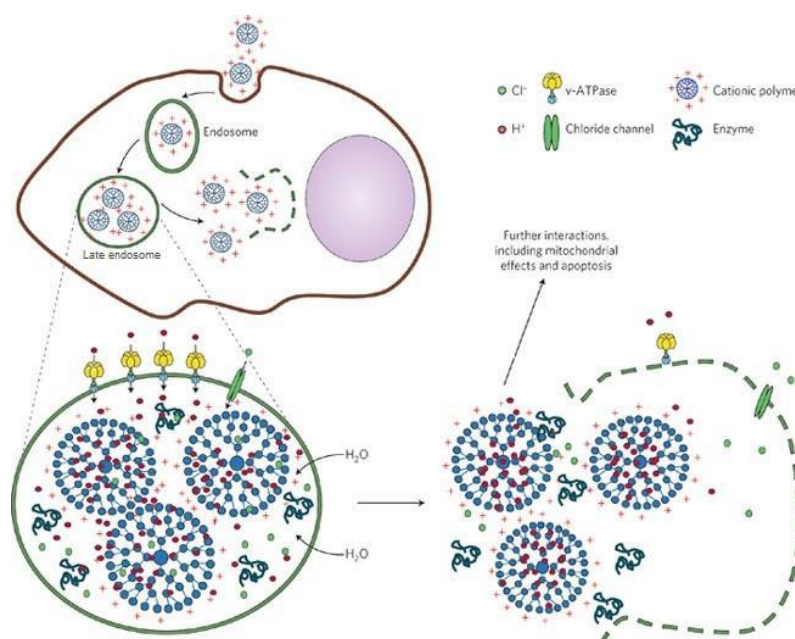


Figure 45. Illustration de l'effet éponge à protons.

Des peptides fusiogènes en milieu acide ont également été utilisés en association avec des liposomes ou des polymères cationiques pour favoriser l'échappement endosomal. Par exemple, les peptides dérivés du peptide fusiogène du virus de la grippe, la

melittine (Meyer et al., 2008) ou encore des peptides riches en histidine comme le peptide H5WYG (GLFHAI AHFIHGGWHGLIHGWYG) qui ajoutés aux polyplexes ou conjugués à des oligonucléotides permet d'améliorer l'efficacité de transfection et de délivrance d'oligonucléotides dans le cytosol des cellules (Asseline et al., 2014; Midoux et al., 1998; Pichon et al., 2001). D'autres peptides riches en motifs histidine ont été greffés de manière covalente à de l'ADN plasmidique afin d'améliorer l'efficacité l'échappement endosomal (Douat et al., 2015). Ceci est attribué à leur capacité de perméabilisation de la membrane des endosomes précoce à pH acide.

Dans le cas du transfert de gènes, une autre barrière intracellulaire existe, celle du noyau, ce qui présente un inconvénient majeur. L'ADN plasmidique délivré doit pénétrer dans le noyau afin d'y être exprimé mais cet aspect ne sera pas abordé puisqu'il ne concerne pas les siRNA et les leurres moléculaires.

Projet

Malgré les nombreuses molécules ayant fait l'objet d'essais cliniques utilisant les siRNA comme agent thérapeutique, aucune d'entre elles n'a atteint le stade de la mise sur le marché. Les obstacles sont encore nombreux et les nouvelles stratégies s'appuient sur le développement de nouveaux systèmes de vectorisation plus performants, capable de délivrer les molécules de siRNA au sein des cellules cibles de manière efficace sans induire d'effets de cytotoxicité. Les stratégies de co-délivrance de molécules sont également en développement afin de combiner les effets de molécules entres elles pour maximiser l'action thérapeutique.

Mon projet s'inscrit dans ce cadre, et consiste en la formulation de nouvelles nanoparticules ciblées capables de délivrer des siRNA dans des cellules tumorales de cancer du sein. Ce projet se divise en trois parties :

1. La formulation de siRNA avec des lipopolyplexes (LPRi) non ciblés.
2. La formulation de siRNA avec des LPRi ciblés.
3. La délivrance des LPRi contenant des siRNA et des leurres moléculaires ADN pour inhiber la prolifération des cellules 4T1 (modèle de cancer mammaire développé spontanément chez la souris Balb/c).

Dans la première partie, le système de vectorisation des siRNA développé s'appuie sur des résultats obtenus au laboratoire concernant des lipopolyplexes histidylés. Ces résultats font l'objet d'un article présenté en annexes dont je rappellerai quelques points: Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection, Gonçalves C., Berchel M., Gosselin MP., Malard V., Cheradame H., Jaffrès PA., Guégan P., Pichon C., Midoux P., Int. J. Pharm, 2014.

Afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses 4T1, j'ai utilisé plusieurs ligands d'adressage tissulaire : le peptide uPA, un fragment de la protéine uPA (urokinase plasminogen activator), une protéase impliquée dans la dégradation de la matrice

extracellulaire et le peptide RGD cyclique se liant aux intégrines $\alpha 5 \beta 3$. Le récepteur uPAR, est trouvé surexprimé dans la lignée 4T1 et est associé à des cancers du sein agressifs. Ensuite, nous nous sommes intéressés à un autre ciblage en utilisant le folate. Il s'agit d'une vitamine agissant comme précurseur d'une coenzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN. Son récepteur est également surexprimé dans les cellules cancéreuses (cancer du sein, des ovaires).

Dans une troisième partie, les LPRi ciblés ont été utilisés pour vectoriser deux types d'acides nucléiques agissant contre la même protéine, la protéine STAT3 : des siRNA anti-STAT3 et des leurres moléculaires ADN anti-STAT3.

Nous montrons que deux types d'acides nucléiques permettent d'obtenir une bonne inhibition de la prolifération des cellules 4T1, alors que les siRNA seuls ont un très faible effet et le leurre ADN un effet plus faible. Ceci se vérifie par la diminution de la protéine STAT3 et d'une de ses cibles Bcl-xL permettant d'envisager leur application *in vivo*.

Résultats

I. Formulation des siRNA par les lipopolyplexes non ciblés

A. Efficacité des lipopolyplexes histidylés dans différentes lignées cellulaires

Sur la base des précédentes études de l'équipe (Mockey et al., 2007; Perche et al., 2011a, 2011b), les formulations que nous avons employées pour formuler des siRNA sont les lipopolyplexes. Ceux-ci sont des complexes ternaires formés à partir d'un acide nucléique, d'un polymère cationique et de liposomes cationiques. Ces lipopolyplexes peuvent être formulés à partir de deux polymères différents. La polyéthylèneimine linéaire de 22 kDa substituée à 16% par des résidus histidine (His-lPEI) (Bertrand et al., 2011) (**figure 1A**) et la polylysine PEGylée histidylée (PEG-HpK) (**figure 1B**), une polylysine de 190 résidus lysine dont 45% des fonctions ϵ -amine sont substituées par des résidus histidines et une fonction par un groupe mPEG de 5 kDa (figure 1B). Les liposomes cationiques (Lip100) utilisés au cours de notre étude sont constitués d'un mélange équimolaire entre le KLN25 (O,O-dioleil-N-[3N-(N-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate) et le MM27 (O,O-dioleil-N-histamine phosphoramidate) dont la structure chimique a été donnée dans les généralités (page 64). Le KLN25 porte une charge permanente sur la tête polaire constitué par un imidazolium. Le MM27 est un lipide pH-sensible qui peut capter des protons H^+ en milieu acide *via* le groupe imidazole de sa tête polaire. Les liposomes et les polymères vont favoriser l'échappement endosomal par protonation de leurs groupes imidazoles et des amines secondaires pour les polymères, et permettre une meilleure délivrance des siRNA dans le cytosol *via* un effet éponge à protons ou fusion membranaire.



Ces deux polymères et les liposomes Lip100 (His-IPEI LPRi100 et PEG-HpK LPRi100) ont été utilisés pour formuler des siRNA. Leur efficacité a été testée dans des cellules HeLa exprimant stablement le gène de l'EGFP (protéine verte fluorescente de la méduse *Aequorea Victoria*), et les cellules B16F10 exprimant stablement le gène de la luciférase. Ces travaux font partie d'une publication (Gonçalves et al, 2014) à laquelle j'ai participé. Ces expériences ont permis de comparer ces lipopolyplexes histidylés à des vecteurs commerciaux (**figure 2**). La transfection de 50nM de siRNA a été réalisée pendant 24h par l'intermédiaire des différents vecteurs et l'inhibition spécifique de l'EGFP (tenant compte de l'inhibition engendrée par la transfection de siRNA scramble, non spécifique de l'ARNm de l'EGFP) a été mesurée par cytométrie en flux au bout de 24h, 48h et 72h. Le maximum d'inhibition (70-80%) est atteint pour tous les vecteurs sauf l'INTERFERin® à 72h post-transfection. Cependant, ce maximum est déjà atteint à 48h par les lipopolyplexes histidylés His-IPEI LPRi100 et PEG-HpK LPRi100 ainsi que les lipoplexes Lip100 alors que dans le cas des vecteurs commerciaux cette inhibition ne dépasse pas 40%.

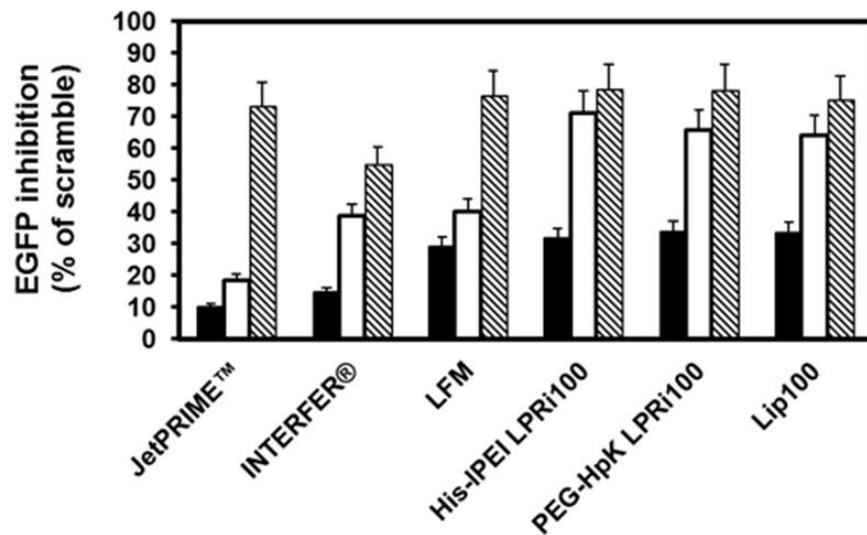


Figure 2: Comparaison de l'inhibition spécifique de l'EGFP entre les lipopolyplexes et les vecteurs commerciaux.

En noir : inhibition spécifique à 24h ; en blanc : inhibition spécifique à 48h et en hachuré : inhibition spécifique à 72h. La transfection a été réalisée dans du milieu sans sérum puis celui-ci est remplacé à 24h par du milieu complet pendant 24h ou 48h. L'efficacité d'inhibition est mesurée par cytométrie en flux et l'inhibition induite par les siRNA scramble a été déduite.

Les mesures de viabilité cellulaire ont permis de vérifier que l'inhibition spécifique de l'EGFP n'était pas due à une toxicité engendrée par la transfection. Dans les mêmes conditions, la viabilité a été mesurée à 48h et 72h post-transfection (**figure 3**). La cytotoxicité des lipopolyplexes histidylés est la plus faible (20-30%) à 48h et 72h alors que la toxicité atteint 50% lors de l'utilisation de la Lipofectamine (LFM) et des lipoplexes Lip100.

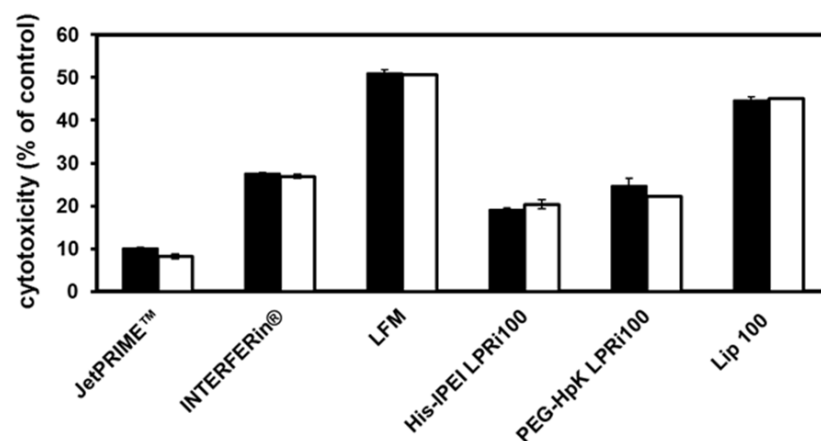


Figure 3: Comparaison de la cytotoxicité post-transfection entre les vecteurs histidylés à 48h (blanc) et 72h (noir).

La transfection des cellules HeLa est réalisée dans les mêmes conditions que pour les mesures d'inhibition de l'EGFP, puis la cytotoxicité est mesurée par un test MTT.

L'efficacité des siRNA anti-EGFP a été également évaluée au niveau de l'ARNm EGFP afin de vérifier les résultats obtenus sur l'expression de la protéine EGFP (**figure 4**). Avec les lipopolyplexes histidylés, environ 50% de l'ARNm de l'EGFP est encore détecté. Ces valeurs sont en concordance avec les résultats obtenus au niveau protéique. L'ARNm de l'EGFP est détecté en plus faible quantité dans le cas de la Lipofectamine® (LFM) et du Lip100 mais ceci peut être attribué à la cytotoxicité des formulations après transfection. En revanche, l'inhibition de l'ARNm mesurée après transfection par le jetPRIME®, est plus élevée que l'inhibition mesurée au niveau protéique.

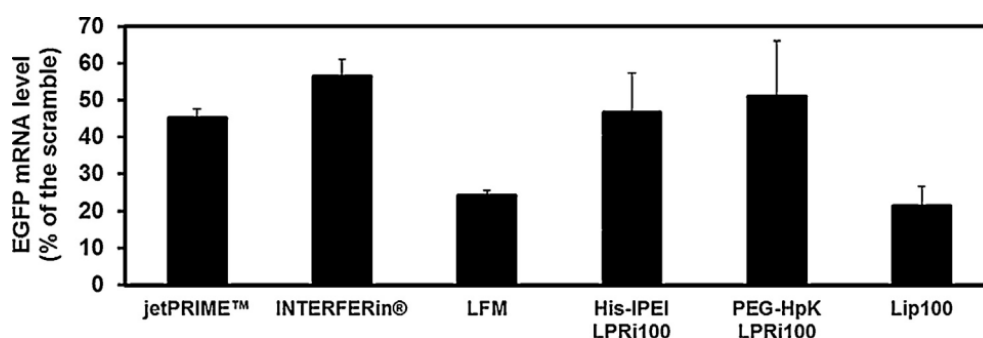


Figure 4: Comparaison des quantités d'ARNm EGFP 48h post-transfection des différents vecteurs.

Les cellules HeLa ont été transfectées pendant 24h puis le milieu a été remplacé par du milieu complet pendant 24h. Les ARN totaux ont été extraits, puis une PCR semi-quantitative a été réalisée. Les échantillons sont ensuite soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose et l'intensité des bandes a été mesurée par Image J.

Tous ces résultats indiquent que les lipopolyplexes histidylés His-IPEI LPRi100 et PEG-HpK LPRi 100 sont des vecteurs efficaces pour la délivrance de siRNA dans les cellules HeLa et ceci en induisant une faible cytotoxicité.

Ces vecteurs ont également été testés dans une autre lignée cellulaire, les cellules B16F10 exprimant stablement la luciférase (B16F10-Luc) (**figure 5**). Une inhibition dépendante de la dose de siRNA utilisée est observée. Dès la plus petite quantité de siRNA utilisée dans cette expérience (6,25 nM), une bonne inhibition de la luciférase est obtenue, respectivement 54,5% et 44% d'inhibition avec PEG-HpK LPRi100 et His-IPEI LPRi100. L'inhibition de la luciférase atteint un maximum de 90% avec 50 nM de siRNA anti-luciférase avec les PEG-HpK LPRi100 et plus de 90% avec les His-IPEI LPRi100. Ces lipopolyplexes histidylés montrent donc également leur efficacité dans cette lignée B16F10 avec un effet plus important pour His-IPEI LPRi100.

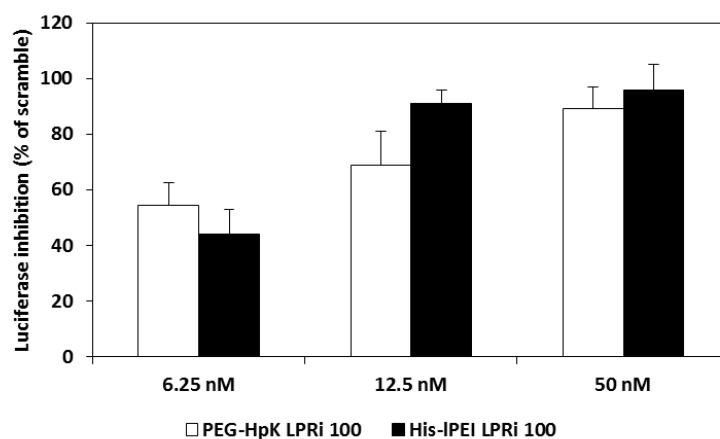


Figure 5: Comparaison de l'inhibition de la luciférase entre les lipopolyplexes histidylés à 48h et 72h post-transfection.

La transfection des cellules B16F10-Luc est réalisée pendant 24h dans du milieu sans sérum puis celui-ci est remplacé par du milieu complet pendant une autre période de 24h. L'efficacité d'inhibition est mesurée par mesure de l'activité luciférase puis normalisée par un dosage des protéines.

Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai testé l'efficacité des His-IPEI LPRi100 sur la lignée 4T1. Il s'agit d'une lignée murine de carcinome mammaire spontanément développé chez les souris Balb/c. Ce modèle a été créé en 1978 par GH Heppner (Dexter et al., 1978; Heppner et al., 1978). Il s'agit d'un modèle orthotopique très reproductible qui permet de modéliser le cancer du sein de stade IV. En effet, après implantation d'une tumeur primaire mammaire, des métastases peuvent se développer spontanément dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie, le cerveau et les os. Ce modèle se rapproche du développement de cancer chez l'humain pour la dissémination des cellules vers les autres organes (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001). Le modèle 4T1 est très agressif de par la capacité d'invasion cellulaire.

Une lignée cellulaire 4T1 exprimant stablement le gène de la luciférase (4T1-Luc) a été produite au laboratoire. Les His-IPEI LPRi100, que nous appellerons par la suite LPRi100, ont été utilisés afin de délivrer des doses croissantes de siRNA anti-luciférase dans les mêmes conditions de transfection que précédemment (**figure 6**). A 48h post-transfection, les LPRi100 inhibent la luciférase de manière dose-dépendante. La plus petite quantité de siRNA utilisée, (6,25 nM) permet une inhibition spécifique de 20%. Cette inhibition atteint un maximum de 84% après délivrance de 50 nM de siRNA anti-Luc. La délivrance de 100 nM de siRNA ne permet pas d'augmenter ce maximum. Ces LPRi100 sont donc également efficaces dans la lignée cellulaire 4T1-Luc.

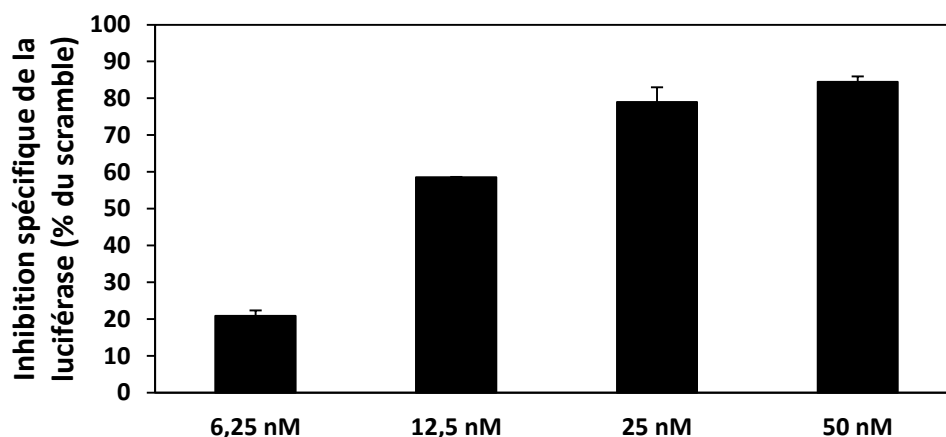


Figure 6: Inhibition spécifique de la luciférase en fonction de la concentration de siRNA délivrée par les LPRi100 48h post-transfection.

Les cellules 4T1-Luc ont été transfectées pendant 24h par les lipopolyplexes, puis le milieu sans sérum a été remplacé par du milieu complet pendant une deuxième période de 24h. L'inhibition a été calculée par mesure de l'activité luciférase puis normalisée par un dosage de protéine. L'inhibition est présentée après le retrait de l'inhibition induite par les siRNA scramble.

B. Effet des lipopolyplexes histidylés *in vivo*

Compte tenu de ces résultats positifs, des expériences ont été réalisées chez le petit animal et en premier lieu afin de mesurer la biodistribution des LPRi100. Dans ce but, des souris femelles Balb/c ont reçu *via* une injection intraveineuse dans la veine caudale, des cellules 4T1-Luc afin d'obtenir la formation de métastases pulmonaires expérimentales. Au bout d'une semaine, les métastases sont apparues et les complexes LPRi100 ont été administrés *via* une instillation endotrachéale. Cette administration réalisée *via* une seringue de micro-injection permet de créer un aérosol contenant de fines particules de lipopolyplexes qui iront se déposer dans les poumons. Cette technique permet une délivrance locale et par conséquent est adaptée pour une délivrance dans des métastases pulmonaires. Les différents composants du LPRi100 (polymère ou liposomes) ont été marqués par des fluorophores puis la fluorescence a été suivie en imageant les animaux. Le polymère His-IPEI a été marqué par le Dylight 800, un fluorophore qui émet dans le proche infra-rouge. Cette émission permet de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus des souris et ainsi de visualiser la fluorescence lors d'une cinétique sur souris vivante, sans avoir à réaliser l'autopsie de l'animal. Les liposomes Lip100 ont été marqués grâce à l'incorporation de 2% d'un lipophosphoramidate fluorescent, le BSV95 (Berchel et al., 2011). Celui-ci possède un groupe chlorocyanine IR-806 qui émet une fluorescence à 713

nm après une excitation à 670 nm. Contrairement au Dylight 800 émettant dans le proche infra-rouge plus lointain, il a été nécessaire de réaliser une autopsie de l'animal afin de mesurer la fluorescence des poumons isolés.

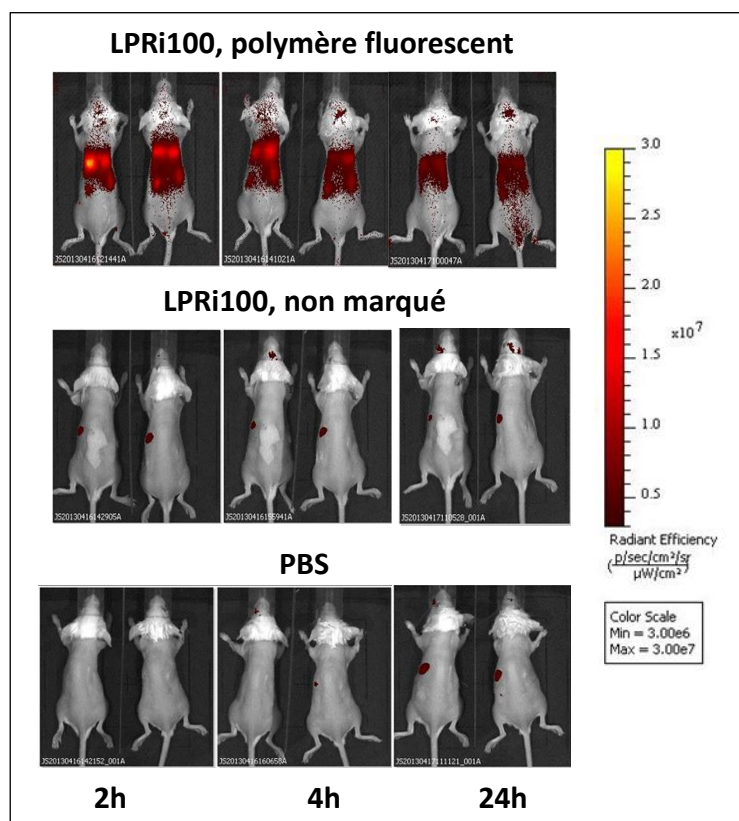


Figure 7: Suivi en cinétique des LPRi100 marqués avec His-IPEI-Dylight800 après administration par instillation endotrachéale.

Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis ont reçu par instillation endotrachéale du LPRi100 contenant 12,5 μg de siRNA. La fluorescence a été suivie par imagerie de fluorescence des animaux (λ_{ex} : 745nm- λ_{em} : 800nm) à 2h, 4h et 24h post-instillation.

Dans le cas du suivi du LPRi100 en visualisant le polymère fluorescent, une cinétique a été réalisée (**figure 7**). Il s'agit d'un suivi sur les mêmes souris car il n'y a pas besoin d'autopsier les animaux. Concernant les souris ayant reçu du PBS et les souris ayant reçu un LPRi100 non marqué, il n'y a aucun bruit de fond. Le LPRi100 marqué est détecté dans les poumons dès la deuxième heure post-instillation et présente le signal le plus intense. Ce signal s'atténue après 4h mais est toujours bien présent à 24h. On peut également noter la présence de signal dans le foie, les reins et la vessie indiquant que le LPRi 100 ou tout au moins le polymère fluorescent a rejoint la circulation sanguine *via* les capillaires sanguins pulmonaires et est éliminé *via* le système urinaire.

Dans le cas du suivi du LPRi100 *via* les liposomes fluorescents, chaque mesure de fluorescence a été réalisée sur des souris différentes après autopsie des animaux (**figure 8**). La figure 8A présente les images des souris après autopsie aux différents temps. De la fluorescence est détectée dans les poumons. Elle est aussi détectée dans les intestins mais elle est principalement due à la fluorescence de la nourriture encore présente. Il ne semble pas y avoir de fluorescence dans le foie et les reins, ce qui suggérerait que contrairement au polymère cationique, les liposomes ne joindraient pas la circulation sanguine présente sur les deux faces des poumons. La figure 8B présente les deux faces des poumons. La fluorescence provenant des liposomes est également détectée dès 2h post-instillation et persiste jusqu'à 24h.

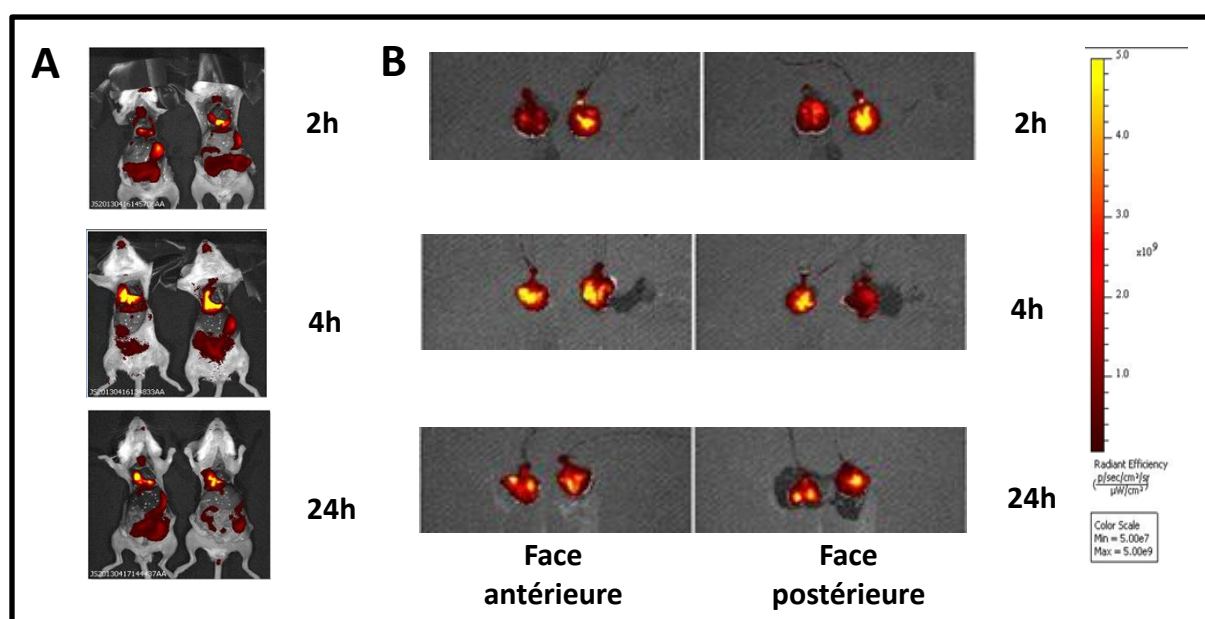


Figure 8: Suivi des LPRi100 marqués avec les liposomes-BSV95 après instillation endotrachéale.

Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis ont reçu les LPRi100 contenant 12,5 μ g de siRNA. La fluorescence (λ_{ex} : 675 nm- λ_{em} : 720nm) a été mesurée à différents temps après autopsie des souris. A/ Imagerie fluorescente des souris ouvertes, avant le retrait des poumons; B/ Imagerie fluorescente des poumons isolés.

Par cette voie d'administration, ces études montrent que le polymère et les liposomes des LPRi100 sont bien distribués dans les poumons des souris et que leurs présences persistent jusqu'à 24h ce qui devrait permettre une bonne délivrance de siRNA thérapeutiques dans des métastases pulmonaires expérimentales.

Des LPRi100 contenant des siRNA anti-luciférase ont été administrés à des souris porteuses de métastases expérimentales 4T1-Luc (**figure 9**). Les LPRi100 ont été administrés soit par instillation endotrachéale (locale) soit par injection dans la veine caudale (systémique) des souris. Il est à noter que les doses administrées ne sont pas les mêmes. En effet, l'administration endotrachéale permet d'injecter un plus faible volume (50 μ L) et donc une plus petite dose de siRNA (12,5 μ g) (ce qui est le maximum possible afin d'éviter l'agrégation des particules) que l'injection systémique (200 μ L) qui permet d'administrer une dose de 50 μ g de siRNA.

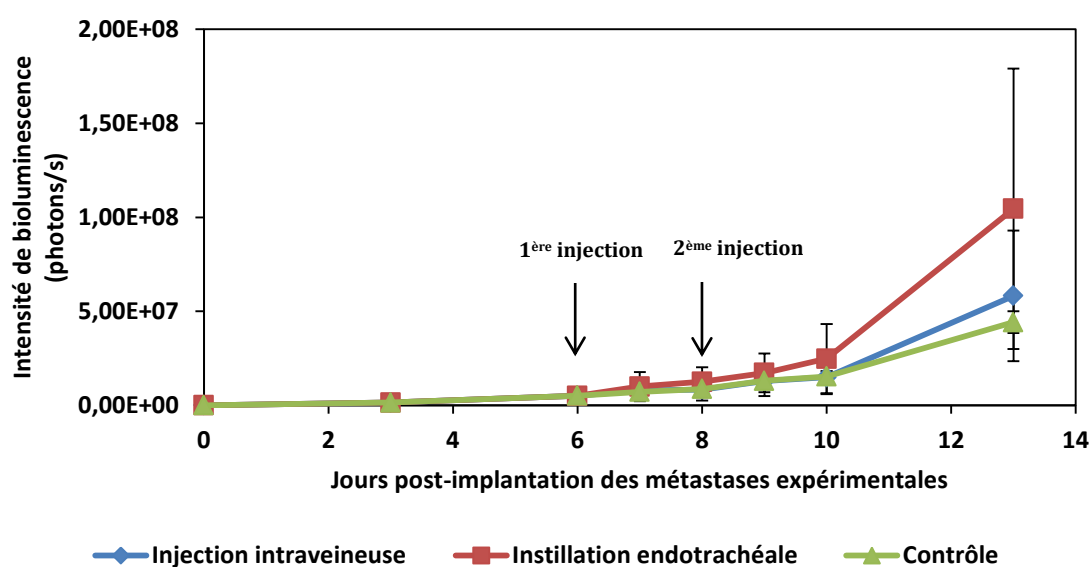


Figure 9: Effet *in vivo* des LPRi100-siRNA anti-luciférase.

Après anesthésie par inhalation d'isoflurane, les souris ont reçu les LPRi100 soit par délivrance systémique (50 μ g de siRNA) (courbe bleue), soit par délivrance locale (12,5 μ g de siRNA) (courbe rouge) aux jours 6 et 8 après injection systémique des cellules 4T1-Luc (métastases pulmonaires expérimentales). Les souris contrôles n'ont subi aucun traitement. L'intensité de bioluminescence est suivie par imagerie de bioluminescence des animaux après injection intrapéritonéale de luciférine.

Six jours (J₆) après l'injection des cellules 4T1-Luc pour induire des métastases pulmonaires expérimentales, une première administration de LPRi100 est effectuée en systémique ou en local suivie d'une deuxième, deux jours plus tard (J₈). Malheureusement, dans les deux cas il n'a pas été possible de voir une diminution du signal de bioluminescence dans les poumons. A J₈, J₉ et J₁₀ il n'y a aucune différence entre l'intensité lumineuse dans les métastases des souris contrôles et des souris ayant reçu des LPRi100 par voie systémique ou locale. A J₁₃, les souris contrôles possèdent même une intensité de bioluminescence plus faible ($4,4 \times 10^7$ p/s) que celle des souris ayant reçu les LPRi100 par

voie locale ($1,0 \times 10^8$ p/s). Pour la délivrance endotrachéale, la dose délivrée n'est pas très élevée (12,5 µg), malgré la bonne biodistribution des nanoparticules dans les poumons obtenue par imagerie de fluorescence. Il se peut que malgré cela, les siRNA n'atteignent pas les cellules 4T1-Luc ou bien ne pénètrent pas dans ces cellules. Le même constat peut être fait pour la délivrance systémique, malgré la plus forte dose (50 µg) de siRNA anti-luc injectée. Deux injections seulement ont été réalisées, il serait également possible qu'il en faille d'autres pour voir un effet. Les LPRi100 utilisés sont cationiques et pourraient comme la plupart des lipoplexes cationiques être bloqués dans les capillaires pulmonaires après injection systémique. Cependant, les résultats de F. Perche montrent qu'avec les lipopolyplexes ADN/PEG-HpK/Lip100, le plasmide n'est pas retenu dans les poumons après injection systémique (Perche et al., 2011a). Cela pourrait aussi expliquer pourquoi il n'y a pas eu d'effet sur les métastases pulmonaires avec les siRNA anti-luciférase après injection systémique. Les résultats de F. Perche montrent également que le plasmide est fortement retenu dans le foie et plus sûrement dans les cellules de Kupffer ce qui ne favorise pas leur présence dans la circulation sanguine.

Afin d'améliorer la délivrance des lipopolyplexes, nous avons décidé de les PEGyler pour augmenter leur circulation dans le sang et d'éviter leur capture par les macrophages du foie. Nous avons aussi décidé de les cibler pour améliorer leur spécificité, vis-à-vis des cellules 4T1, et leur internalisation.

II. Formulation des siRNA par les lipopolyplexes ciblés.

A. Couplage de peptides sur les liposomes

Le ciblage des LPRi100 a été entrepris en les couplant avec un peptide spécifique des cellules 4T1. La stratégie utilisée a été de faire le couplage du peptide directement sur les liposomes Lip100. Pour cela un lipide PEGylé contenant le groupe maléimide à l'extrémité du PEG (le DSPE PEG2000 Maléimide) a été incorporé à hauteur de 5% mol. à la formulation de départ de Lip100. Ce lipide permet la formation d'une liaison thioether

stable après couplage avec un peptide contenant une cystéine à son extrémité N-terminale ou C-terminale (**Figure 10**).

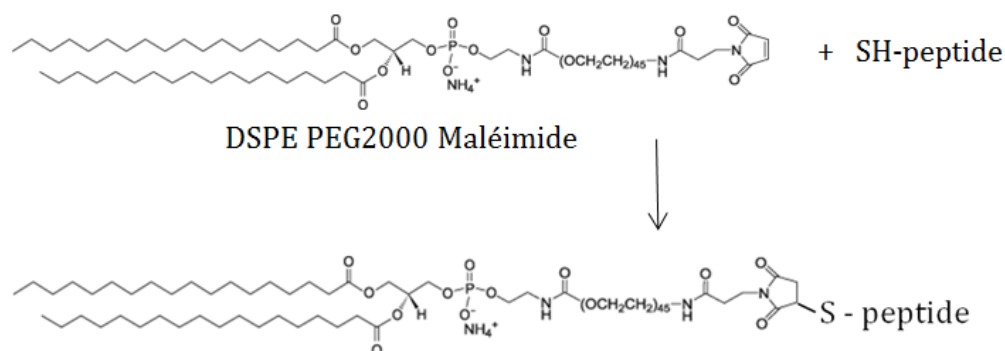


Figure 10: Couplage d'un peptide thiolé sur un lipide maléimide

Après formation de Lip100 avec 5% de DSPE PEG2000 Maléimide (Lip100MAL) dans un tampon HEPES 10 mM, pH 7,4, le peptide thiolé solubilisé dans le même tampon est mis à réagir en présence de 2 mM DTT avec les liposomes durant 1 nuit à 4°C, puis l'excès de peptide est éliminé par une dialyse contre de l'HEPES.

Le ciblage des cellules 4T1 par les LPri100 a été envisagé en utilisant différents peptides : le peptide RGD cyclique (RGDc) (**figure 11A**) et/ou le peptide uPA (**figure 11B**). Le peptide ASSLNIA a également été utilisé en tant que peptide contrôle non spécifique des 4T1 (**figure 11C**). Les peptides sont fixés aux liposomes par l'intermédiaire du groupe thiol présent sur le peptide RGD et sur la cystéine ajoutée à l'extrémité N-terminale des peptides uPA et ASSLNIA.

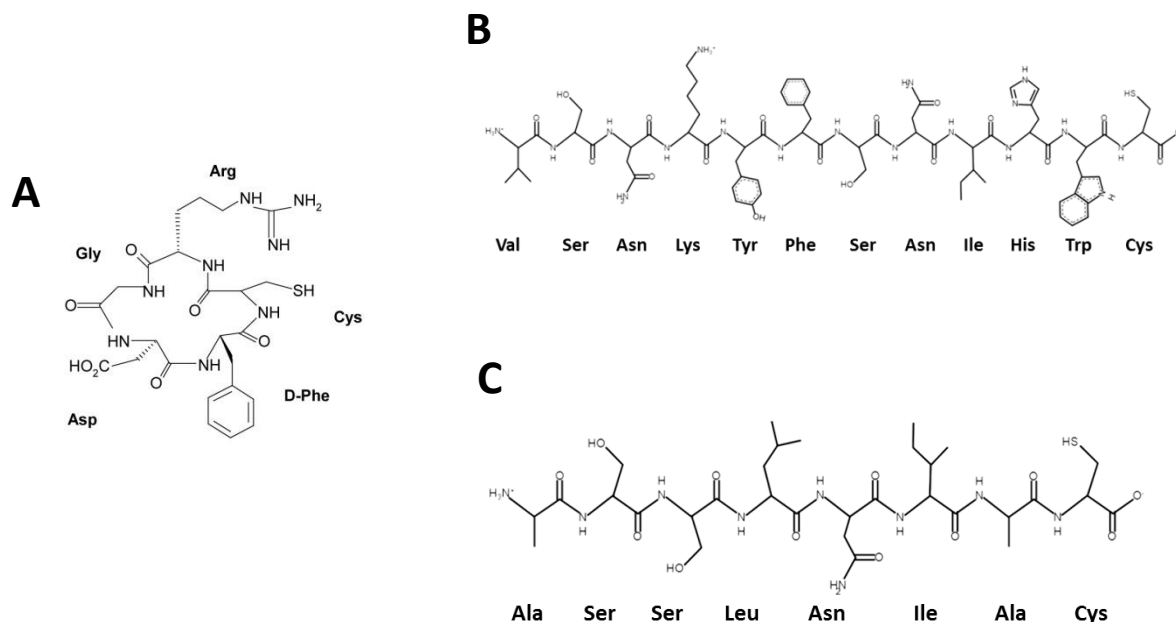


Figure 11: Structure chimique des peptides utilisés pour le ciblage des cellules 4T1.

A/ Structure chimique du peptide RGDc ; B/ Structure chimique du peptide uPA ; C/ Structure chimique du peptide ASSLNAC.

Le peptide RGDc, est un petit peptide cyclique de 5 acides aminés comprenant le motif RGD qui est fixé par les intégrines $\alpha V\beta 3$. Ces intégrines sont souvent surexprimées par les cellules cancéreuses et témoignent d'une activité angiogénique (Chakravarty et al., 2015). L'expression de ces intégrines est retrouvée à la surface des cellules 4T1 où elles participeraient à la formation de métastases osseuses (Sloan et al., 2006).

Le peptide uPA de séquence VSNKYFSNIHW est un peptide de la protéine uPA qui est reconnu par le récepteur uPAR (urokinase plasminogen activator receptor), protéine impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Appella et al., 1987). Le domaine de la protéine uPA qui permet la liaison au récepteur uPAR est localisé dans le domaine GFD (Growth Factor Domain) qui contient le peptide uPA et a été modélisé par des études cristallographiques (Llinas et al., 2005). Le peptide uPA possède une affinité de l'ordre du μM pour le récepteur uPAR (Wang et al., 2009).

Le récepteur uPAR est trouvé surexprimé dans différents cancers, comme le cancer du sein (Grismayer et al., 2012), de la prostate (Qi et al., 2015) ou encore du foie (Zhou et al., 2014) et est associé à un pronostic défavorable. Ce récepteur est surexprimé par les cellules 4T1 (Yang et al., 2013). Il a été exploité afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses dans le cas de la thérapie génique. Le domaine GFD a été intégré au sein de

nanoparticules d'oxyde de fer afin d'effectuer l'imagerie de tumeurs mammaires (Yang et al., 2009). Le peptide de 11 acides aminés a été utilisé afin d'améliorer le transfert de gènes dans les cellules DU145, du cancer de la prostate (Wang et al., 2009).

Le peptide non spécifique ASSLNIA, utilisé en tant que contrôle négatif, a été identifié par la méthode du phage display, une technique qui permet un screening à haut débit des interactions protéiques pour se fixer sur les cellules musculaires squelettiques de souris telles que les C2C12 (Samoylova and Smith, 1999). Ce peptide a été utilisé comme ligand pour rendre sélectifs des vecteurs viraux tels que des AAV (Yu et al., 2009). *In vitro*, l'ajout de ce peptide a permis l'amélioration de la transfection des cellules C2C12 en comparaison à un AAV non ciblé, et *in vivo* une meilleure expression du transgène de la luciférase a été obtenue par délivrance intramusculaire et intraveineuse. Pour le couplage, une cystéine a été ajoutée en position N- (CASSLNIA) ou C-terminale (ASSLNIAIC).

Des liposomes doublement ciblés ont également été préparés à partir des deux liposomes ciblés séparément. Après leur mélange équimolaire, ceux-ci ont été lyophilisés, repris dans l'éthanol et évaporés pour faire un film lipidique à partir duquel les liposomes Lip100 contenant 2,5% de peptide uPA et 2,5% de peptide RGDc sont obtenus après hydratation dans le tampon 10 mM HEPES pH 7,4.

B. Caractérisation physique des liposomes ciblés

1. Analyse des liposomes par RMN

La composition des liposomes Lip100 a été étudiée, dans un premier temps, afin de vérifier la composition des Lip100 après dialyse puis dans un second temps afin de s'assurer de la présence de peptide après le couplage. Tout ceci a été analysé à partir des spectres RMN ^1H .

a) Composition du Lip100

Dans le cas du Lip100, les spectres RMN des lipides KLN25 et MM27 ont d'abord été réalisés séparément et analysés puis le spectre RMN des liposomes dialysés a été

enregistré puis analysé. Tous les pics ont été identifiés dans les différents spectres (**figures 12 à 14**).

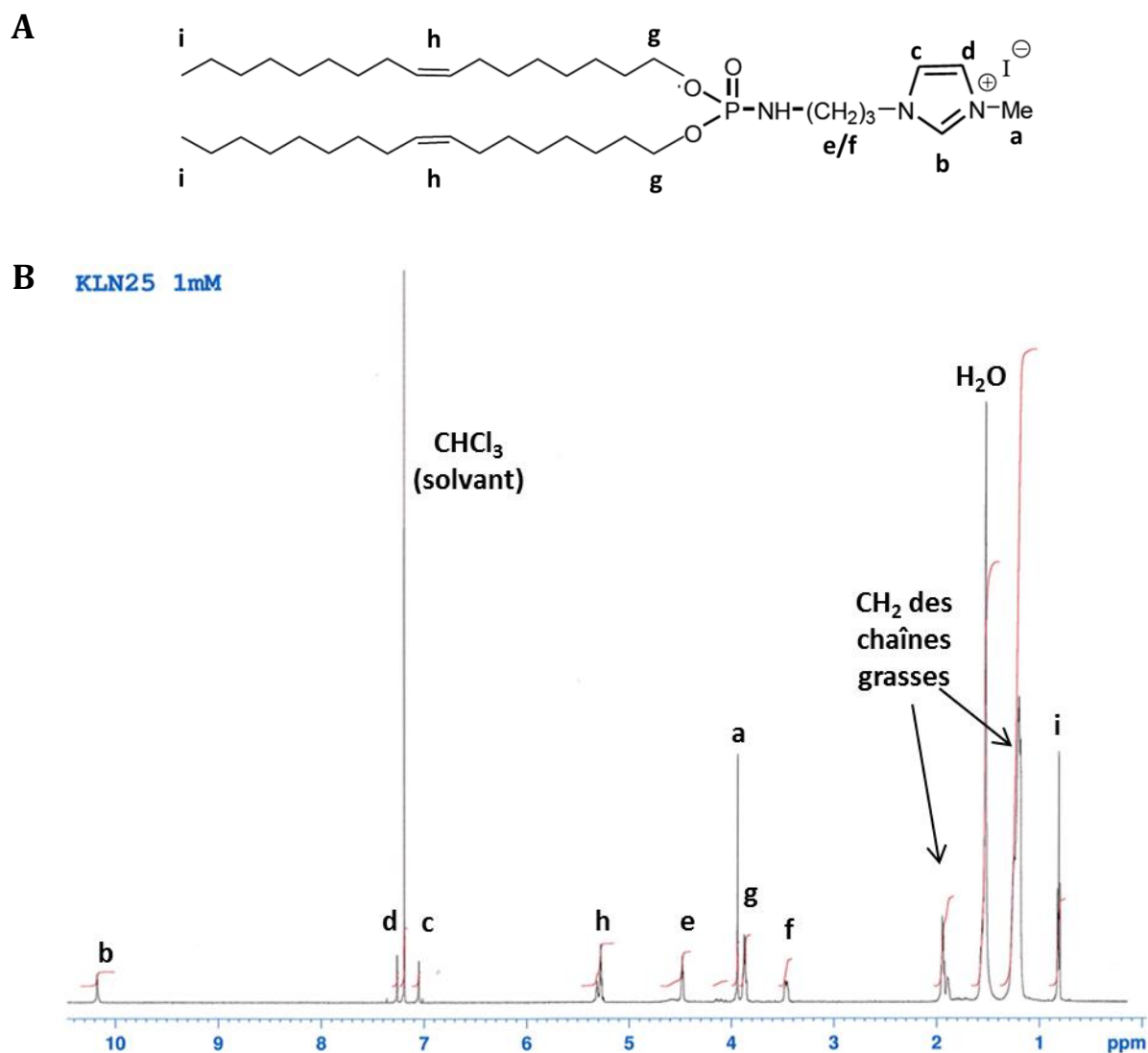
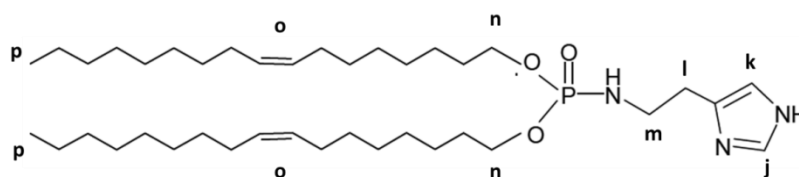


Figure 12: Spectre RMN ^1H du KLN25.

A/ Structure du KLN25 ; B/ Spectre RMN du KLN25. Le lipide pur a été séché durant une nuit dans une étuve sèche à 37°C puis dissout à une concentration de 1 mM dans du chloroforme deutéré. Les spectres RMN sont réalisés avec un spectromètre BRUKER 600MHz.

A



B

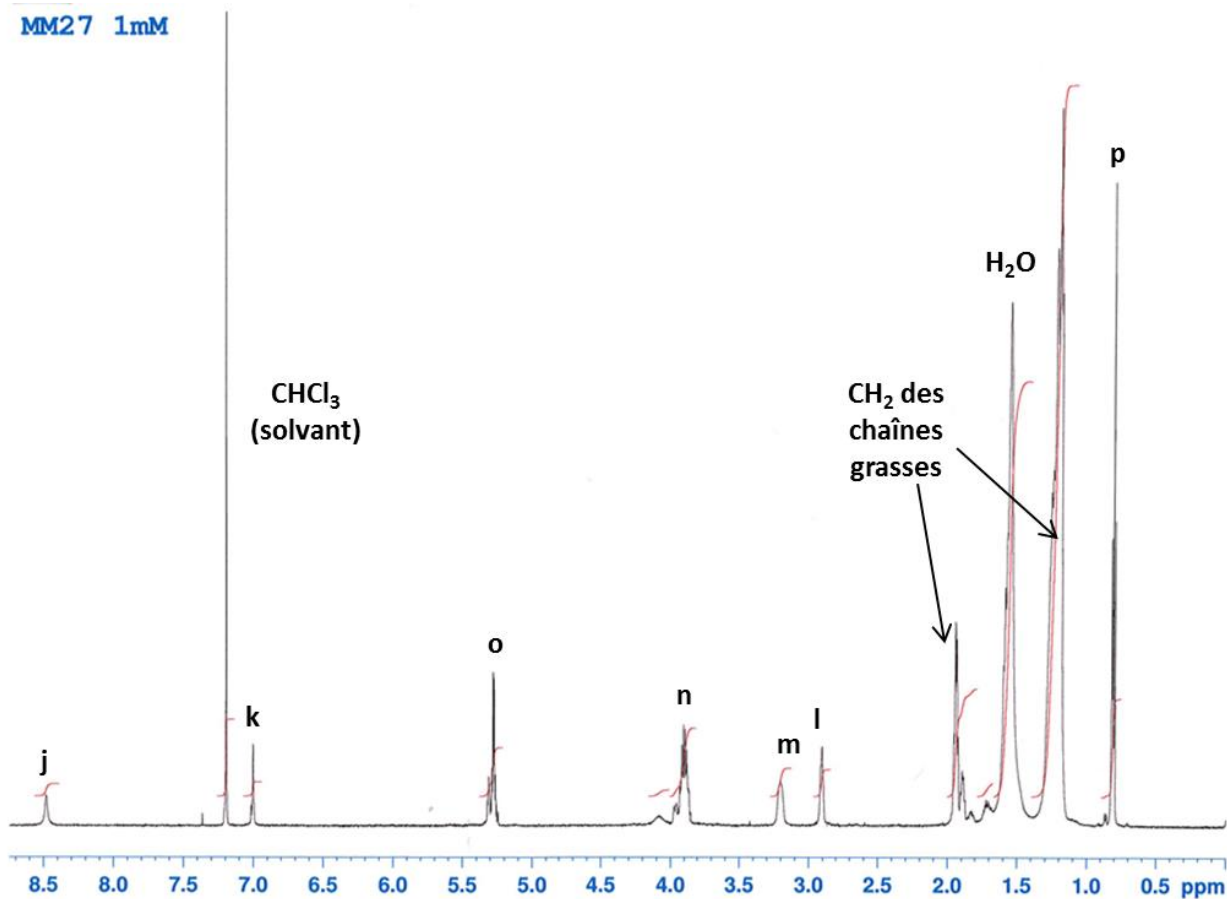


Figure 13: Spectre RMN ¹H du MM27.

A/ Structure du MM27 ; B/ Spectre RMN du MM27. Le lipide pur a été séché durant une nuit dans une étuve sèche à 37°C puis dissout à une concentration de 1 mM dans du chloroforme deutéré. Les spectres RMN sont réalisés avec un spectromètre BRUKER 600MHz.

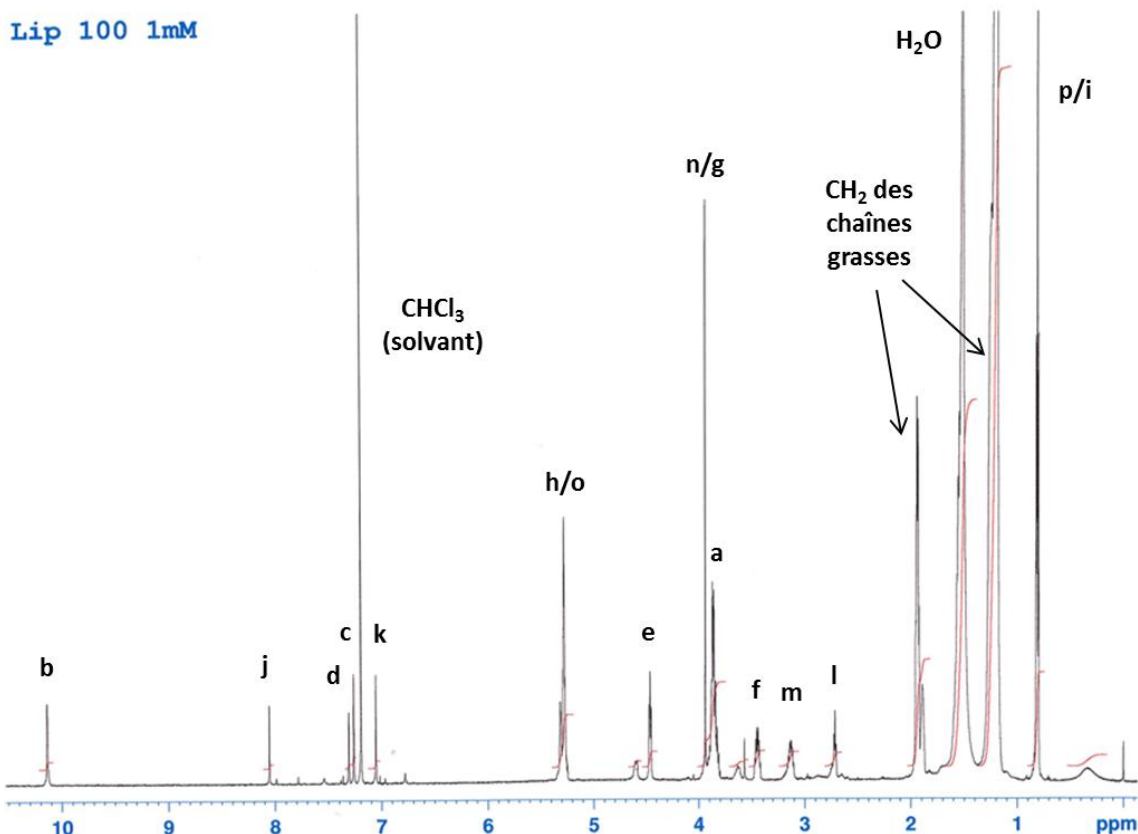


Figure 14: Spectre RMN ^1H du Lip100.

Les liposomes Lip100 dialysés contre de l'HEPES 10mM, pH 7,4 ont été ensuite lyophilisé puis dissout à une concentration de 1mM dans du chloroforme deutéré. Les spectres RMN sont réalisés avec un spectromètre BRUKER 600MHz.

En examinant les spectres RMN ^1H du KLN25 et du MM27 on remarque que les pics f du KLN25 à 3,5 ppm et m du MM27 à 3,2 ppm sont spécifiques de chacun des lipides (**figure 12 et 13**). Ils représentent tous deux 2 protons. On les retrouve bien dans le spectre du Lip100 ce qui permet de quantifier le rapport KLN25/MM27 dans les Lip100 à partir de la valeur de leurs intégrales sur le spectre RMN du Lip100 (**figure 14**). Ce rapport des valeurs des intégrales pour un Lip100 constitué de 50% de KLN25 et 50% de MM27 doit être de 1, ce qui est le cas (**Tableau 1**). Par conséquent, Lip100 contient bien après dialyse en mélange équimolaire du KLN25 et du MM27.

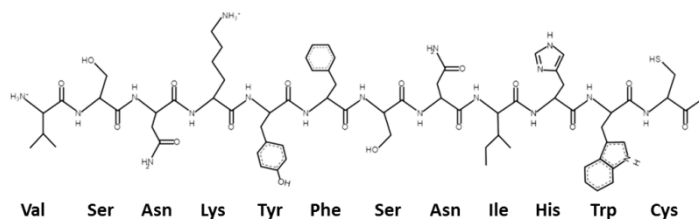
Tableau 1 : Valeurs des intégrales des pics RMN spécifiques du KLN25 et MM27 dans Lip100 et calcul du rapport KLN25/MM27 dans Lip100.

Spectre	Valeur de l'intégrale du pic f (KLN25)	Valeur de l'intégrale du pic m (MM27)	Rapport des intégrales KLN25/MM27
Lip100	1,05	0,97	1,08

b) Détermination du couplage du peptide uPA sur les liposomes

Le peptide de ciblage uPA a été intégré aux liposomes Lip100MAL *via* son couplage sur le lipide maléimide après formation du liposome. Afin de vérifier l'efficacité du couplage du peptide, des spectres RMN ^1H ont été réalisés sur les liposomes. Trois spectres RMN différents ont été réalisés dans le DMSO deutéré (DMSO d_6) le peptide n'étant pas soluble dans le chloroforme deutéré: celui du peptide seul uPA (**figure 15**), de Lip100MAL (sans peptide) (**figure 16**) et de Lip100uPA après dialyse (**figure 17**).

A



B

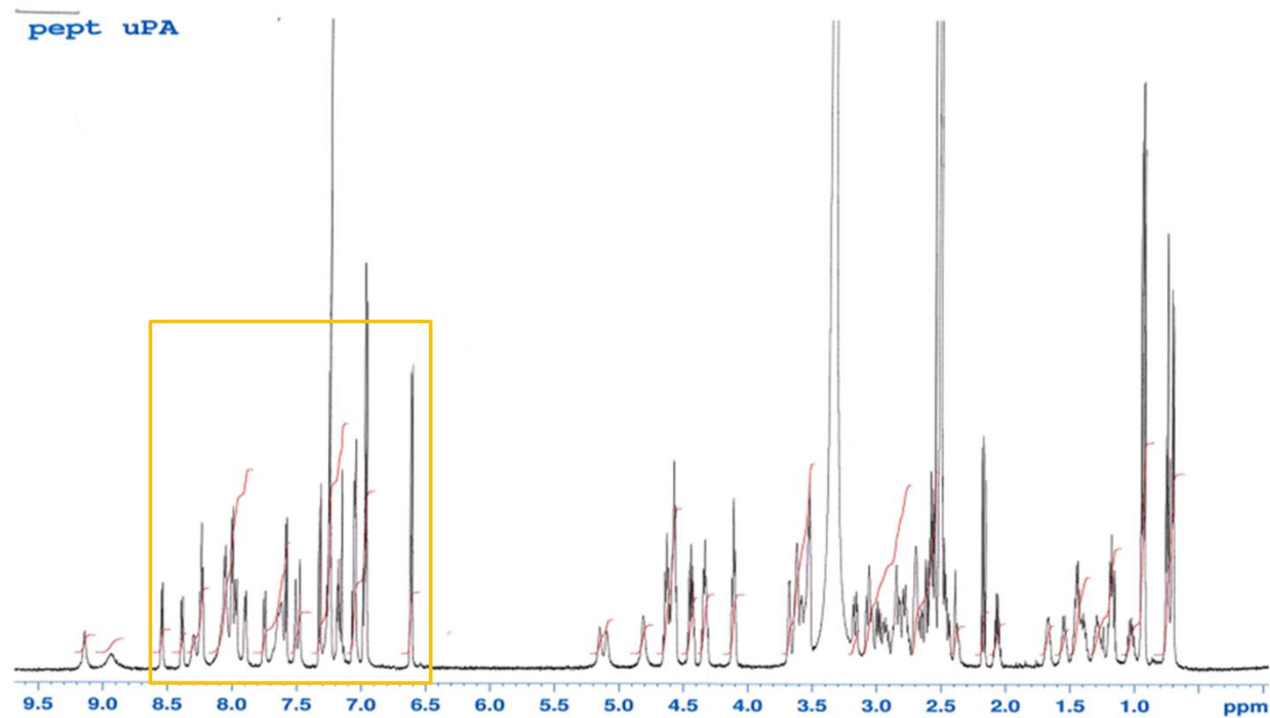


Figure 15: Spectre ^1H RMN du peptide uPA.

A/ Structure chimique du peptide uPA ; B/ Spectre RMN du peptide uPA. Encadré jaune : région de pics caractéristiques du peptide uPA. Le peptide a été repris dans du DMSO d_6 à une concentration de 1mM. Les spectres RMN sont réalisés avec un spectromètre BRUKER 600MHz.

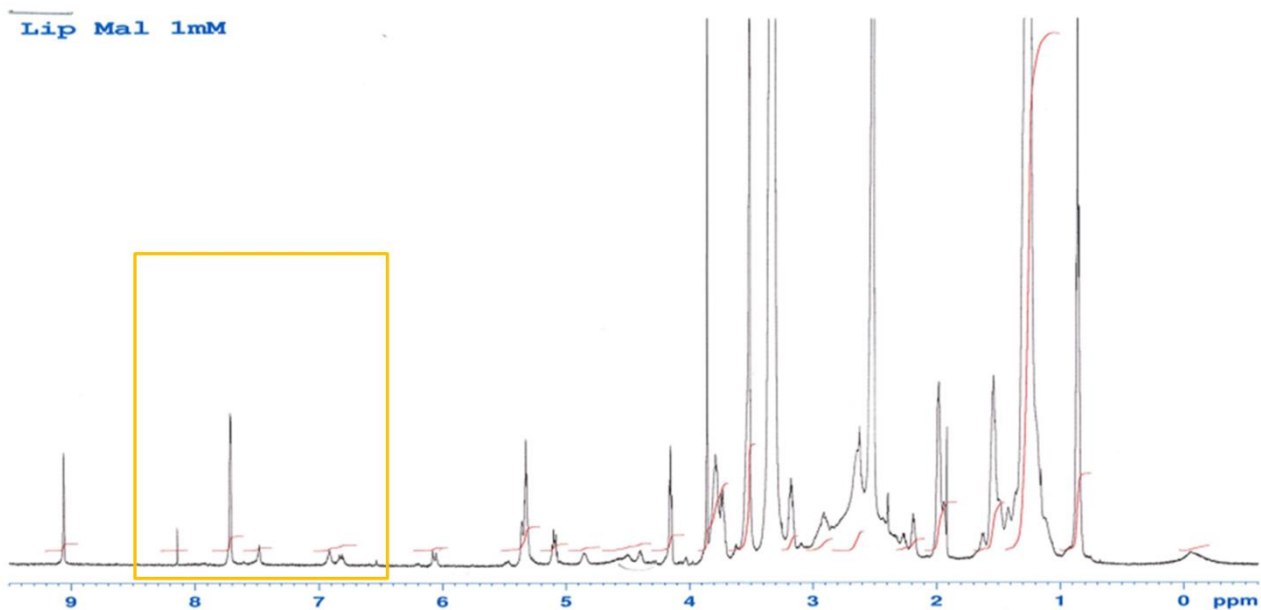


Figure 16: Spectre ^1H RMN du Lip100MAL.

Encadré jaune : absence des pics caractéristiques du peptide uPA. Les Lip100MAL dialysés sont ensuite lyophilisés puis dissous à une concentration de 1 mM dans du DMSO d6. Les spectres RMN sont réalisés avec un spectromètre BRUKER 600MHz.

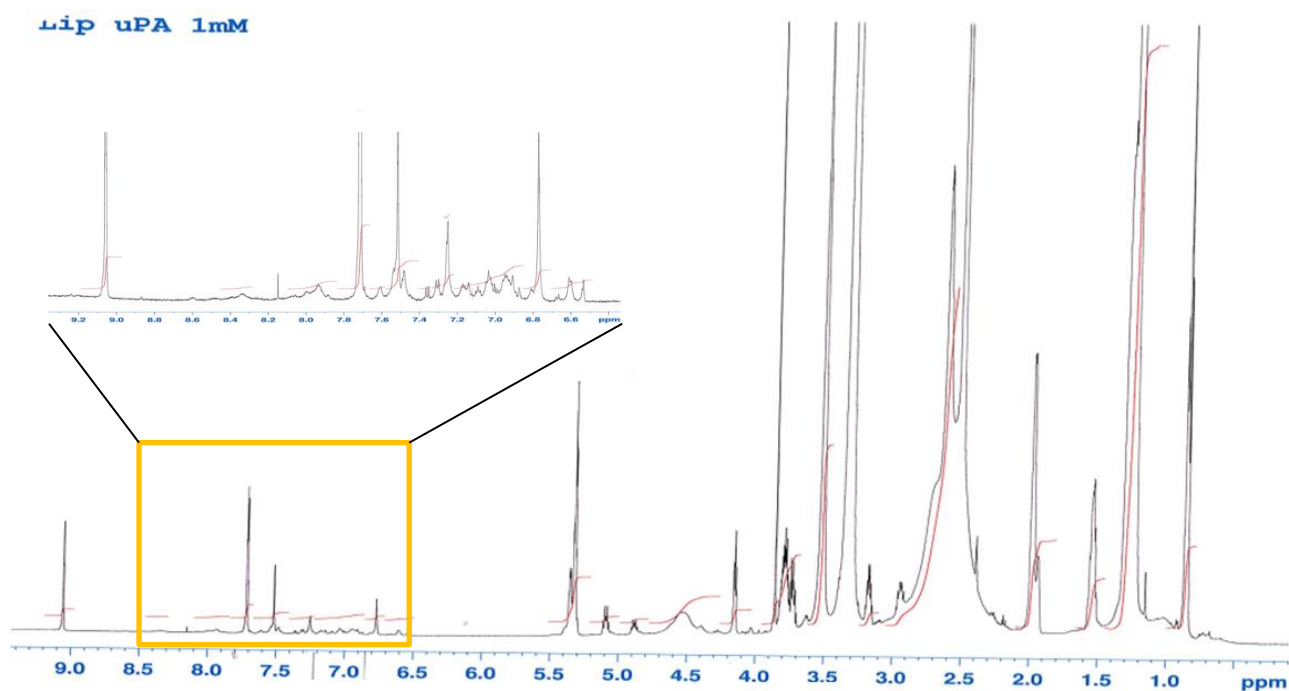


Figure 17: Spectre ^1H RMN du Lip100uPA.

Encadré jaune : présence de pics caractéristiques du peptide uPA et agrandissement du spectre. Les Lip100MAL-uPA dialysés sont ensuite lyophilisés puis dissous à une concentration de 1 mM dans du DMSO d6. Les spectres RMN sont réalisés avec un spectromètre BRUKER 600MHz.

Des pics appartenant au peptide uPA (encadrés en jaune) sur le spectre RMN du peptide pur uPA (**figure 15**) ne sont pas retrouvés dans le spectre du Lip100MAL (**figure 16**) mais apparaissent dans celui du Lip100uPA (**figure 17**). Les autres pics du peptide (non encadrés) ne sont pas visibles sur le spectre des liposomes car ils sont masqués par le signal des lipides. Cependant, la présence de ces pics du peptide atteste de la présence de celui-ci avec les liposomes du fait que les liposomes sont dialysés après la réaction de couplage pour éliminer le peptide non couplé aux liposomes. Ainsi, le peptide détecté grâce au spectre RMN est donc attaché aux liposomes, cependant sa quantification n'a pu être effectuée.

2. Taille et potentiel ζ des liposomes ciblés

Après couplage de ces peptides sur le Lip100MAL, ceux-ci ont été caractérisés par leur taille et leur potentiel ζ , respectivement par mesure de la diffusion dynamique de la lumière et par mesure de la mobilité électrophorétique (**tableau 2**).

Tableau 2: Mesure de la taille et du potentiel ζ des différents liposomes ciblés.

	Lip100MAL	Lip100RGD	Lip100uPA	Lip100 uPA-RGD	Lip100 CASSLNIA	Lip100 ASSLNIA	Lip100 ASSLNIA- RGD
Taille (nm)	256±14	168±13	175±9	173±10	192±8	187±11	185±15
Potentiel ζ (mV)	27±1	31±1	32±2	28±4	30±1	31±2	29,6±1

Tous les liposomes ciblés ont une taille comprise entre 168 et 192 nm ce qui est plus faible que celle des Lip100MAL (256 nm). Tous les liposomes possèdent un potentiel ζ positif voisin de 30 mV qui ne varie pas de manière significative selon les différents peptides couplés et qui reste semblable aux liposomes non ciblés.

3. Complexation des siRNA par les liposomes ciblés

Dans un premier temps, la capacité de complexation des siRNA par les différents composants du lipopolyplexes, His-IPEI et Lip100 a été étudiée, puis des lipopolyplexes à différents rapports ont été formés (**figure 18**).

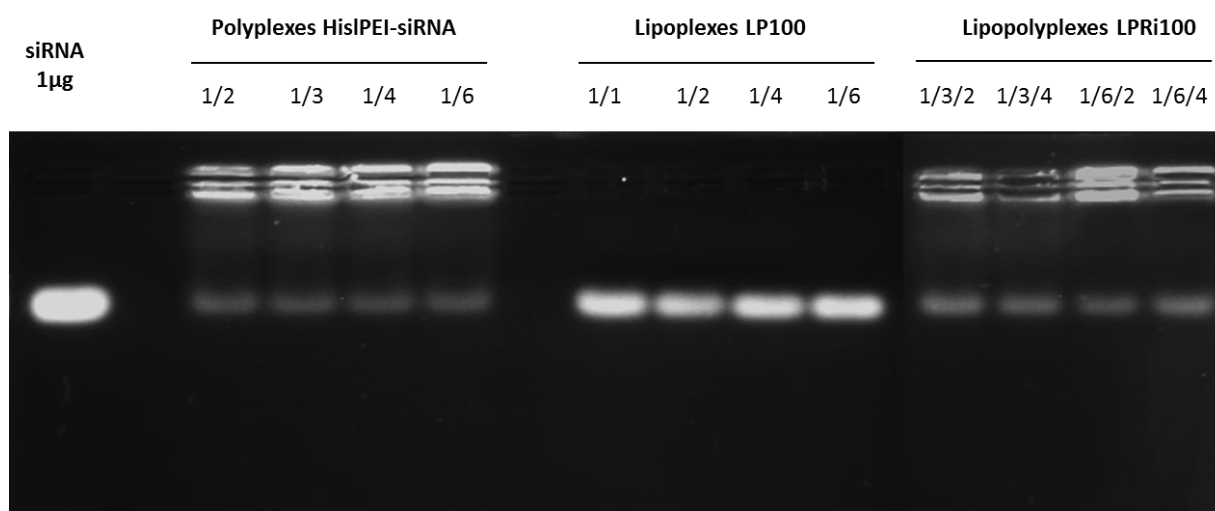


Figure 18: Complexation des siRNA sous forme polyplexes, lipoplexes et lipopolyplexes.

Les polyplexes sont réalisés avec 1 µg de siRNA complexés à différentes quantités de His-IPEI (rapport exprimé en µg siRNA/µg polymère). Les lipoplexes sont réalisés avec 1 µg de siRNA complexés à différentes quantités de Lip100 (rapport exprimé en charge siRNA/charge liposome). Les lipopolyplexes sont réalisés avec 1 µg de siRNA complexés à différentes quantités de His-IPEI et de Lip100 (rapport exprimé en µg siRNA/µg polymère et charge siRNA/charge liposome). Les complexes sont réalisés puis mis à migrer dans un gel d'agarose à 2% contenant du BET.

Les trois types de complexes siRNA (polyplexes His-IPEI, lipoplexes Lip100 et LPRi100) sont tous efficaces pour la complexation de cet acide nucléique (**figure 18**). Cependant, les siRNA ne sont jamais complexés dans leur totalité. Lorsque la quantité de His-IPEI est augmentée jusqu'au rapport 1/6, ceci ne suffit pas à complexer la totalité des siRNA (85% de siRNA sont complexés). Les lipoplexes sont moins efficaces avec environ 60% des siRNA qui sont complexés à tous les rapports. Enfin les lipopolyplexes réalisés avec le polymère et les liposomes permettent une complexation de 70% des siRNA quelques soient les rapports.

Dans le cas des polyplexes et des lipopolyplexes où la complexation est effectuée par le polymère His-IPEI, la quantité de siRNA libre peut s'expliquer par le fait que les siRNA sont des petites molécules très peu flexibles. Ainsi, la condensation des siRNA est moins efficace qu'avec un plasmide ADN.

Les liposomes ciblés ont également été utilisés pour former des lipopolyplexes et testés par gel retard. Ces lipopolyplexes ont été complexés avec de l'ADN plasmidique (**figure 19A**) ou des siRNA (**figure 19B**).

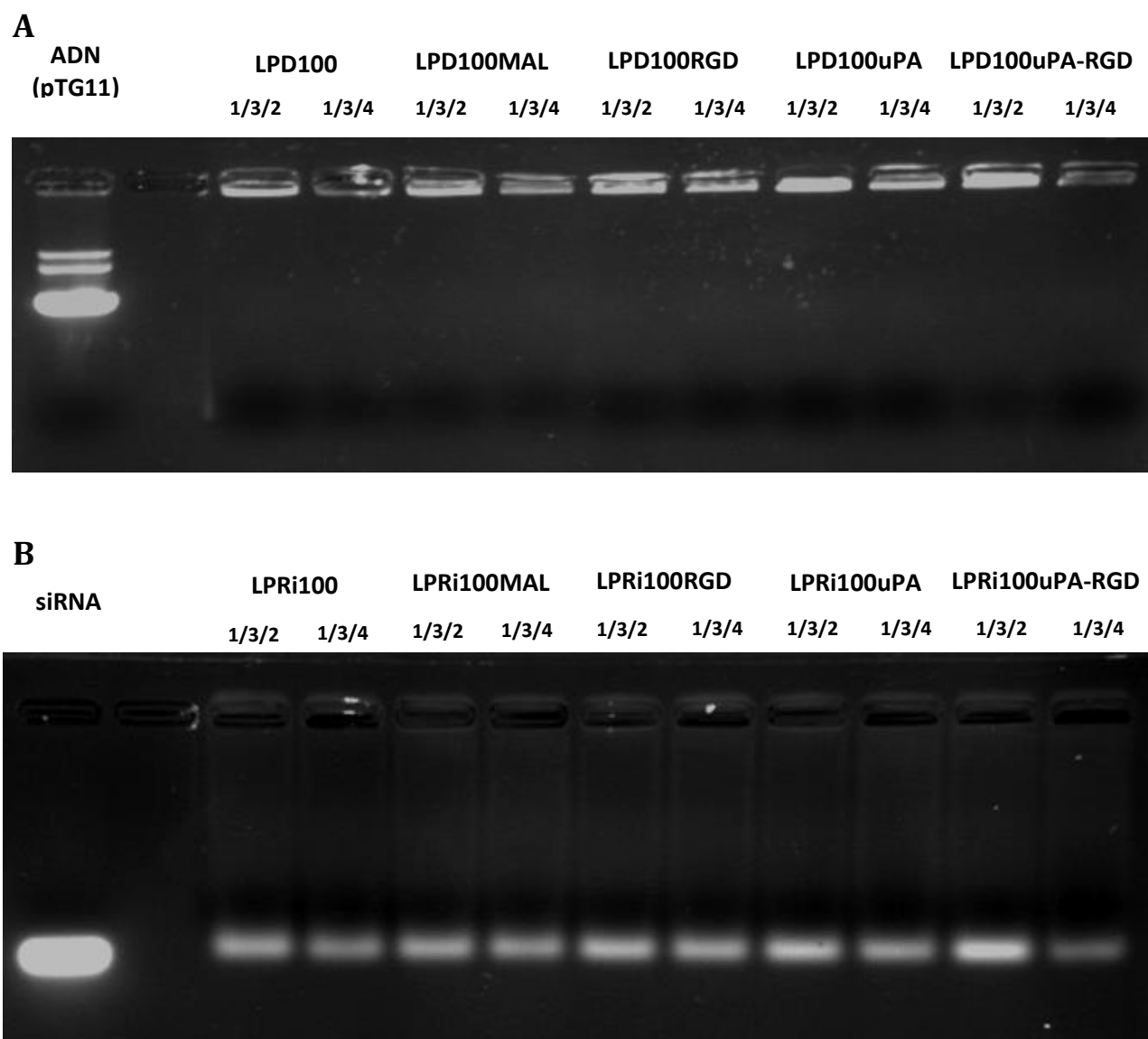


Figure 19: Formulation des acides nucléiques par les lipopolyplexes ciblés.

A/ Lipopolyplexes ciblés formulés avec de l'ADN ; B/ Lipopolyplexes ciblés formulés avec des siRNA. Les lipopolyplexes sont réalisés avec 1 µg de siRNA ou d'ADN complexés à différents rapports avec le His-IPEI et le liposome ciblé (rapport exprimé en µg siRNA/µg polymère et charge siRNA/charge liposome). Les complexes sont réalisés puis mis à migrer dans un gel d'agarose à 2% contenant du BET.

Dans le cas des lipopolyplexes ADN (LPD), la complexation de l'ADN est totale dès le rapport 1/3/2 (**figure 19A**). Comme vu précédemment, la complexation des siRNA est différente puisque la complexation totale n'est jamais atteinte et est de l'ordre de 70% dans tous les cas (**figure 19B**).

C. Internalisation des liposomes ciblés

1. Internalisation par les cellules 4T1

Afin de tester l'apport du ligand de ciblage greffé sur les liposomes, des expériences d'internalisation par différents types de cellules ont été menées. L'internalisation par les cellules 4T1 a été mesurée en utilisant les liposomes seuls, les lipoplexes et les lipopolyplexes. Deux peptides de ciblage ont été testés : le peptide RGD et uPA, ainsi que les liposomes greffés avec ces deux peptides. Dans toutes les expériences suivantes, les liposomes sont fluorescents suite à l'incorporation d'un lipophosphoramidate fluorescéine. La fluorescence est analysée trois fois (**figure 20**). Tout d'abord l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) totale des cellules est mesurée sans traitement des cellules (=fluorescence A) ; puis après ajout de bleu trypan pour éteindre la fluorescence de la fluorescéine à l'extérieur des cellules (=fluorescence B). La différence A-B donnera la MFI en surface des cellules. Dans un troisième temps, la monensine est ajoutée, pour équilibrer le pH dans tous les compartiments intracellulaires avec le pH extracellulaire (pH 7,4) puisque la fluorescéine à pH acide est partiellement éteinte (= fluorescence C).

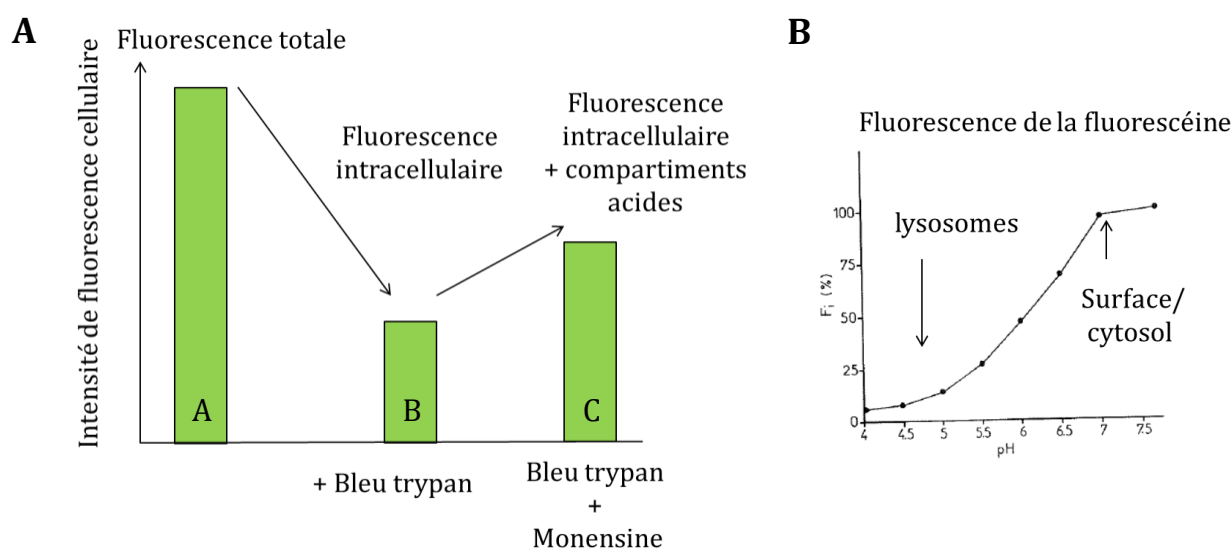


Figure 20: Mesure de l'internalisation par cytométrie en flux en utilisant la fluorescence de la fluorescéine.

A/ Mesure de l'intensité de fluorescence en fonction du traitement par le bleu trypan et la monensine ; B/ Intensité de fluorescence de la fluorescéine en fonction du pH.

A la surface des cellules 4T1, il y a une forte accumulation des liposomes doublement ciblés uPA-RGD (MFI: 147). La fixation du Lip100uPA (MFI: 71) et du

Lip100RGD (MFI: 45) est plus faible mais plus grande que les liposomes non ciblés Lip100MAL (MFI: 21) (**figure 21A**). A l'intérieur des cellules, c'est également les liposomes doublement ciblés qui présentent une accumulation sept fois plus importante à 4h que les liposomes non ciblés. Les liposomes ciblés par le peptide uPA ou le peptide RGD sont quant à eux présents avec la même intensité à 4h (MFI : 30) (**figure 21B**). L'effet monensine est très faible à 1h et 2h d'incubation ce qui indique que les liposomes ne sont pas ou que très peu de liposomes sont dans des compartiments acides (**figure 21C**). Après 4h, l'effet monensine est fort (>2) pour les liposomes uPA-RGD et moindre pour les autres liposomes. L'endocytose de ces liposomes s'effectue probablement *via* la voie clathrine. Le fait que l'effet monensine n'est observable qu'après 4h d'incubation signifierait que la délivrance des liposomes dans les endosomes et lysosomes est assez longue.

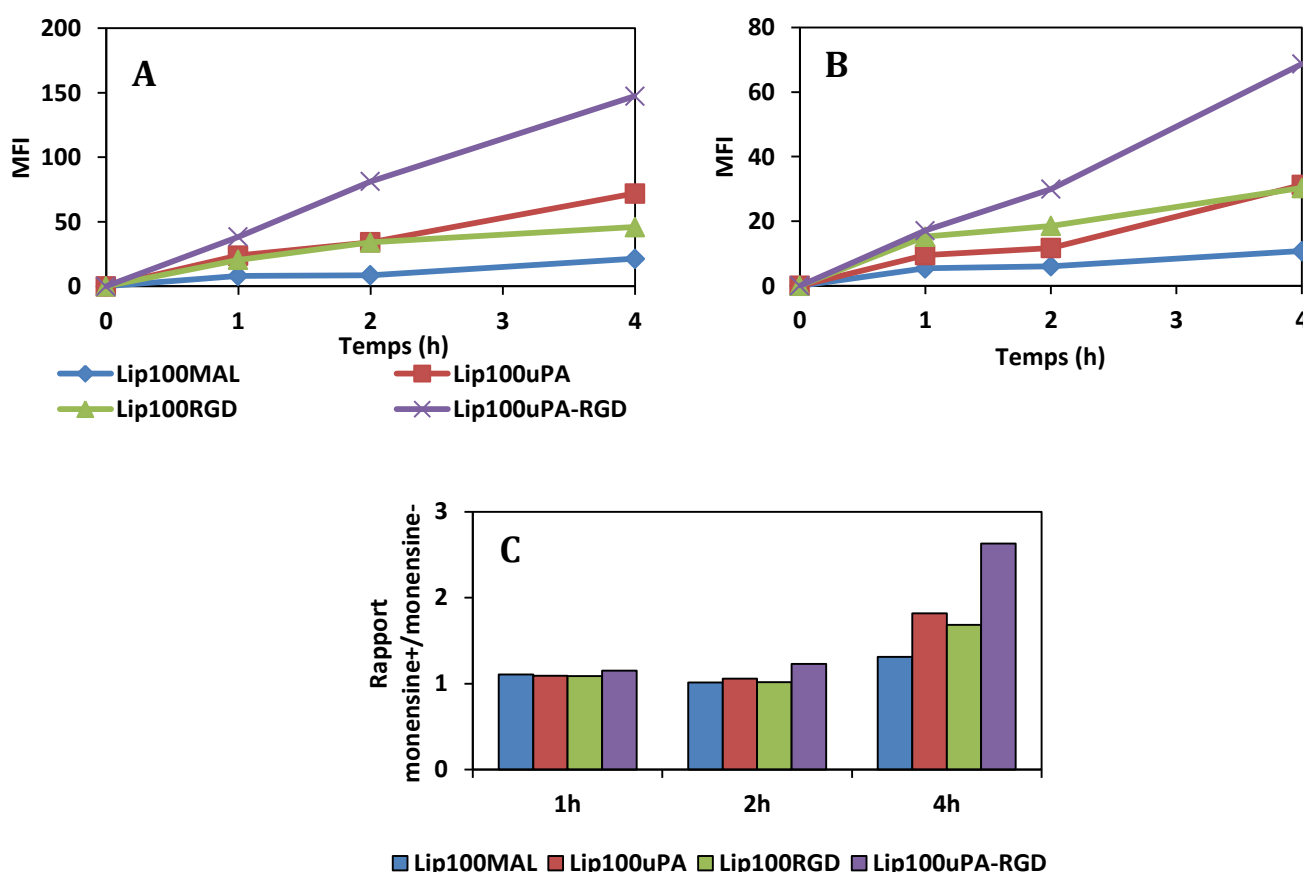


Figure 21: Internalisation des liposomes ciblés par les cellules 4T1.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (= fluorescence totale A – fluorescence après traitement au bleu trypan B); B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (=fluorescence C) ; C/ Effet monensine : rapport des MFI après traitement au bleu trypan puis à la monensine (fluorescence C)/avant le traitement par la monensine (fluorescence B). Les cellules sont incubées avec les liposomes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

Sous forme lipoplexes (LP, complexes ADN/liposomes), la cinétique d'endocytose n'est pas la même que pour les liposomes seuls. LP100RGD est celui qui pénètre le mieux dans les cellules 4T1 à 4h d'incubation, avec une MFI de 34,7 (**figure 22B**). Il est plus particulièrement localisé dans les compartiments acides car l'effet monensine est élevé (2,6). Cependant, il y a assez peu de sélectivité apportée par le greffage des peptides, puisque les valeurs de MFI restent assez proches des LP100MAL. Malgré une bonne fixation en surface, LP100uPA pénètre peu dans les cellules 4T1. LP100uPA, n'est pas présent dans les compartiments acides à 4h, car l'effet monensine n'est pas supérieur à 1 (**figure 22C**). Contrairement aux résultats concernant l'internalisation des liposomes seuls, LP100uPA-RGD se fixe en surface et pénètre le moins dans les cellules 4T1 (MFI : 7,9 sous forme LP et MFI : 26,1 en liposome seul à 4h). Il semblerait que la complexation avec les acides nucléiques perturbe la reconnaissance des ligands par leur récepteur et/ou modifie l'internalisation.

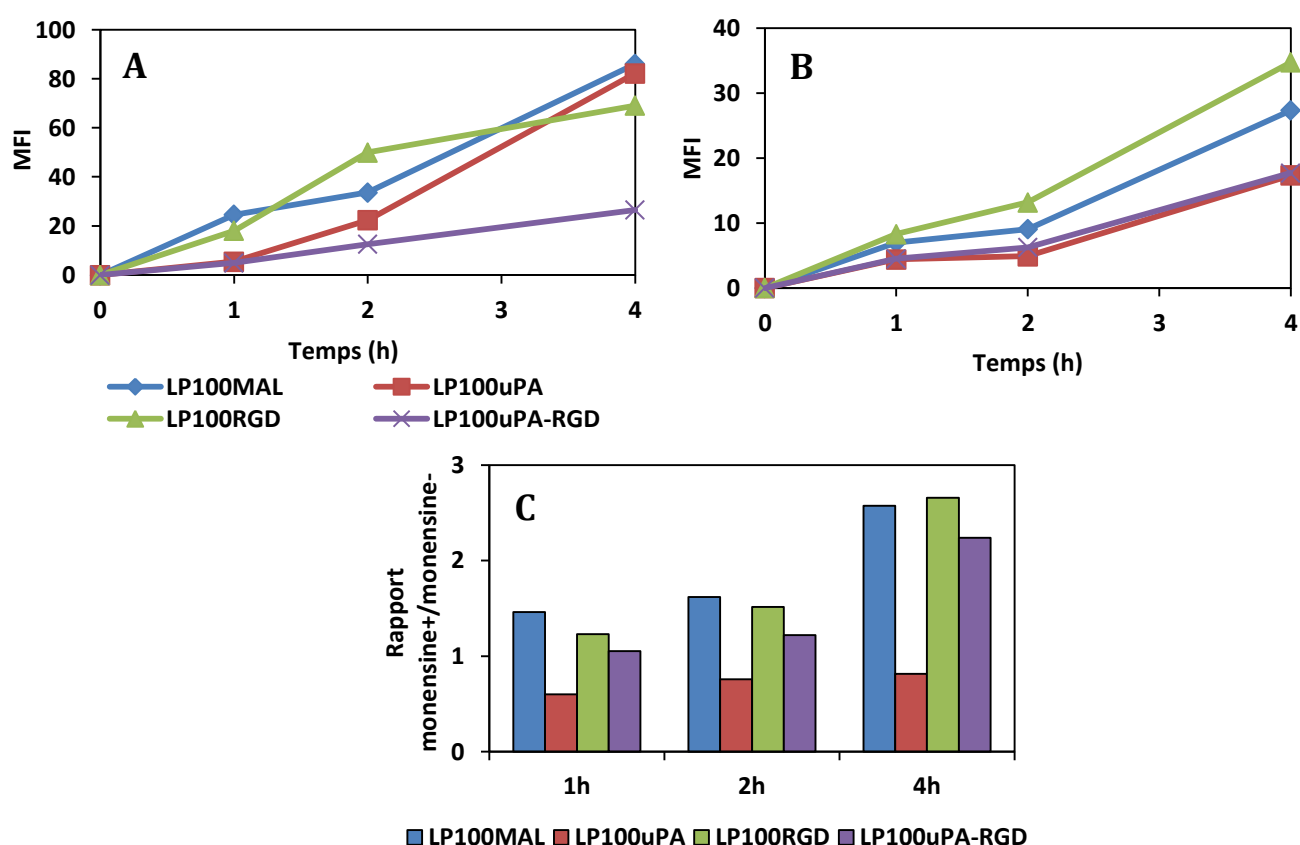


Figure 22: Internalisation des lipoplexes ciblés sur 4T1.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (fluorescence A-B) ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (fluorescence C) ; C/ Effet monensine (fluorescence C/B). Les cellules sont incubées avec les lipoplexes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

Concernant l'internalisation des lipopolyplexes contenant un plasmide ADN, les LPD100uPA-RGD sont ceux qui s'accumulent le plus à la surface cellulaire (MFI : 88 à 4h) comme avec les liposomes seuls (**figure 23A**). Les autres lipopolyplexes s'accumulent de la même manière, avec des MFI inférieures à 40. A l'intérieur des cellules, en revanche, les LPD100uPA possèdent la MFI la plus importante à 4h (34), contre 16 pour les LPD100MAL non ciblés indiquant une meilleure endocytose de ces lipopolyplexes (**figure 23B**). Le trafic intracellulaire des lipopolyplexes uPA est un peu plus rapide que les lipopolyplexes et liposomes seuls équivalents, puisque l'effet monensine est observable dès 2h mais reste faible (1,4) même après 4h (**figure 23C**). Lorsque l'on considère les compartiments acides, l'effet monensine est sensiblement le même, autour d'1,4, pour tous les lipopolyplexes.

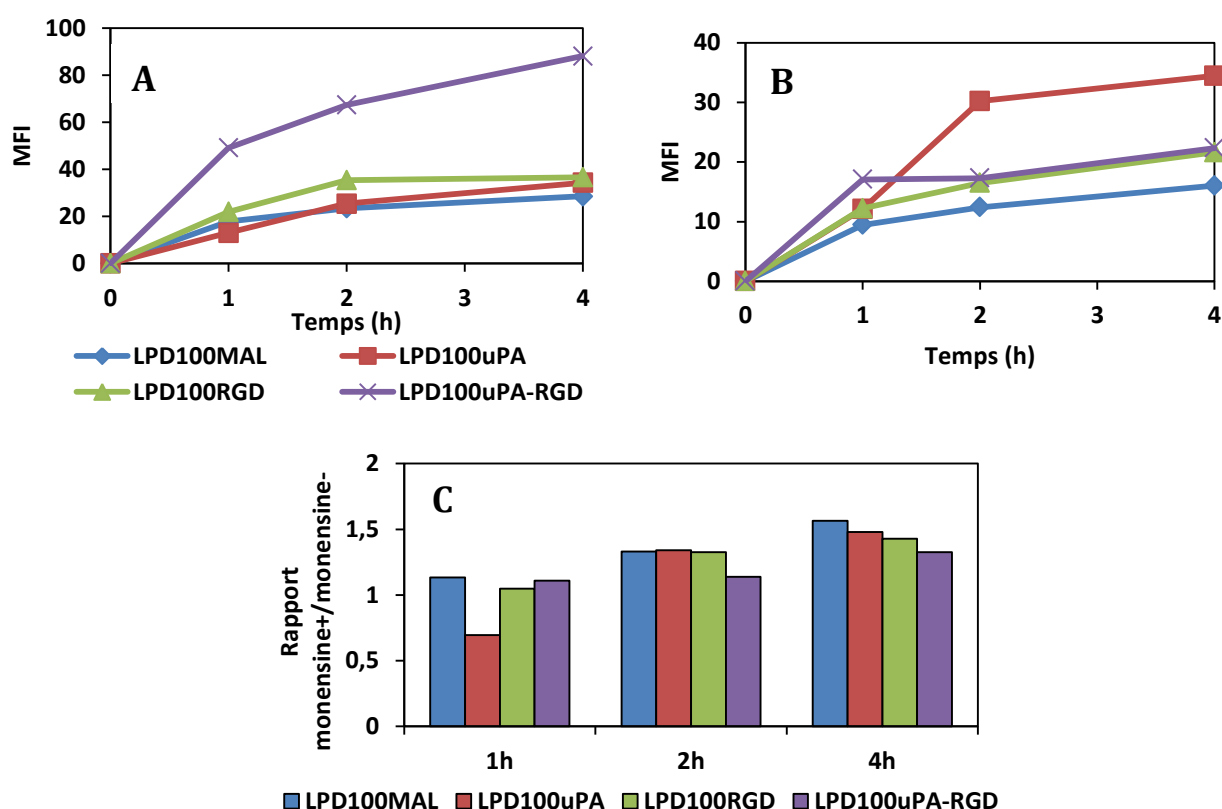


Figure 23: Internalisation des lipopolyplexes-ADN ciblés sur 4T1.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (fluorescence A-B) ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (fluorescence C) ; C/ Effet monensine (fluorescence C/B). Les cellules sont incubées avec les lipopolyplexes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

L'internalisation a également été mesurée pour les lipopolyplexes ciblés contenant des siRNA. A la surface cellulaire, les LPRI qui s'accumulent le plus sont les LPRI100MAL et

RGD (MFI respectives de 14 et 12 à 4h) (**figure 24A**), contrairement au LPRi100uPA (MFI : 8 à 4h). A l'intérieur des cellules, une meilleure internalisation des LPRi100RGD et uPA est mesurée mais les différences de ces derniers avec le LPRi100MAL ne sont pas très significatives (**figure 24B**). L'effet monensine de tous les lipopolyplexes dépasse 1 dès 1h, ce qui démontre une délivrance des LPRi rapide dans les endosomes et les liposomes. L'internalisation des lipopolyplexes siRNA semblerait suivre la même tendance que les lipoplexes ADN (**figure 22**).

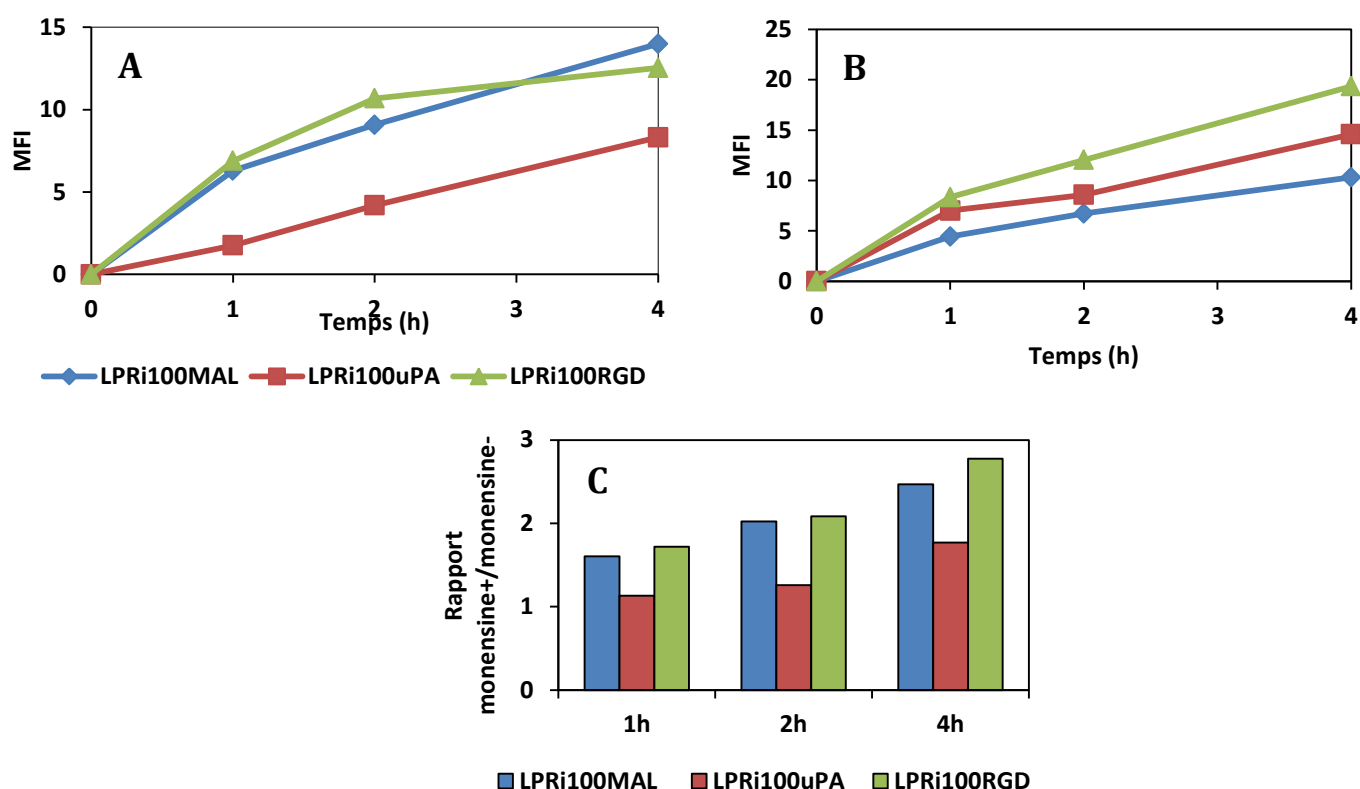


Figure 24: Internalisation des lipopolyplexes-siRNA ciblés sur 4T1.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (fluorescence A-B) ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (fluorescence C) ; C/ Effet monensine (fluorescence C/B). Les cellules sont incubées avec les lipopolyplexes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

Tableau 3 : Résumé de l'efficacité d'internalisation des nanoparticules en fonction du peptide de ciblage.

Type de complexe	Peptide uPA	Peptide RGD	Peptides uPA-RGDc
Liposomes seuls	+	+	++
Lipoplexes ADN (LP)	+	++	+
Lipopolyplexes ADN (LPD)	+++	+	+
Lipopolyplexes siRNA (LPRI)	+	++	/

A travers ces expériences, nous pouvons constater que la cinétique d'endocytose n'est pas la même selon le type de complexes (**tableau 3**). Ces différences peuvent s'expliquer par l'exposition de l'élément de ciblage qui peut ne pas être la même. En effet, lorsque les liposomes sont sous forme lipoplexes ou lipopolyplexes, le peptide de ciblage peut ne pas être exposé de la même manière à la surface de ces particules ou y en avoir moins suite à l'organisation supramoléculaire résultante de l'interaction des liposomes et du polymère avec les acides nucléiques ce qui peut diminuer sa reconnaissance. Sous la forme de liposomes, le peptide de ciblage possède une meilleure exposition que lorsque les liposomes sont complexés à un acide nucléique. Cependant, les résultats obtenus avec les lipoplexes et les lipopolyplexes ciblés sont différents ce qui peut également s'expliquer par une organisation supramoléculaire différentes entre lipoplexes et lipopolyplexes. En effet, il est admis que les lipoplexes sont des structures en oignon où les acides nucléiques sont intercalés entre les bicouches lipidiques (Sternberg et al., 1994; Gustafsson et al., 1995; Weisman et al., 2004). Les lipopolyplexes ont quant à eux des structures plus hétérogènes parfois sphériques ou parfois polygonales (Jin et al., 2010; Ewe et al., 2014). Ces structures apparaissent parfois comme l'encapsulation des polyplexes dans les liposomes. Des polyplexes pourraient également s'intercaler entre les bicouches lipidiques ce qui entrainerait un assemblage plus irrégulier (Mockey et al., 2007). Cependant, des études plus poussées seraient nécessaires afin de mieux définir ces différentes structures.

Après 4h d'internalisation, les complexes uPA se trouvent dans les compartiments acides, témoignant d'une endocytose probable *via* la voie clathrine ce qui serait en accord avec ce que l'on sait de la protéine uPA. Lorsqu'elle se lie à son récepteur uPAR, elle devient active et permet la conversion du plasminogène en plasmine (Ellis et al., 1991). Afin de

réguler l'activité de cette protéine, celle-ci est la cible d'inhibiteurs, tels PAI-1 et PAI-2 (plasminogen activator inhibitor type-1/2). PAI forme un complexe avec uPA qui est toujours capable de se lier à uPAR. Ceci déclenche l'endocytose de ce récepteur *via* la voie clathrine. Le complexe est ensuite éliminé dans les lysosomes et le récepteur est recyclé à la membrane plasmique (Czekay et al., 2001). Le peptide de ciblage uPA, qui ne possède aucune activité enzymatique permettrait aussi l'endocytose par voie clathrine des liposomes, lipoplexes et lipopolyplexes.

Dans le cas du double ciblage uPA-RGD, il n'est pas encore défini si le récepteur uPAR et les intégrines interagissent directement ensemble. Cependant, il a été établi que les complexes uPA-uPAR peuvent se regrouper dans les radeaux lipidiques avec les intégrines (Wei et al., 2008). Le récepteur uPAR pourrait induire une signalisation *via* les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ et $\alpha V \beta 3$ ce qui produirait des effets différents. La signalisation *via* le co-récepteur $\beta 1$ induirait une prolifération cellulaire et l'invasion en activant la voie Raf/MEK/ERK (Liu et al., 2002b). La signalisation *via* $\beta 3$ induirait une migration *via* la protéine Rac, qui permettrait la polymérisation de l'actine participant à la migration cellulaire (Wei et al., 2008). De plus, il a été démontré, que l'internalisation d'uPAR pourrait être dépendante des intégrines. En effet, lorsque des cellules sont incubées avec le peptide RGD soluble (10 $\mu\text{mol/L}$), les récepteurs uPAR sont internalisés puis redistribués à la surface cellulaire (Prager et al., 2004). Ainsi, les complexes doublement ciblés pourraient être mieux internalisés en cumulant les effets des peptides uPA et RGDc. Cependant, dans notre cas, le double ciblage qui apporte un effet bénéfique pour les liposomes seuls ne semble pas apporter de bénéfice supplémentaire pour l'internalisation des complexes.

Les liposomes ont été formulés afin de contenir 5% de peptide uPA. Cependant, ce pourcentage n'est peut-être pas optimal pour améliorer l'endocytose. Afin de le vérifier, des liposomes comprenant différents pourcentages (1%, 2%, 5%, 7%, et 10%) de peptide uPA ont été préparés. Les liposomes contrôles comportant le même pourcentage de Maléimide ont également été réalisés. Leur efficacité d'endocytose a été mesurée pour des lipopolyplexes-ADN (**figure 25**).

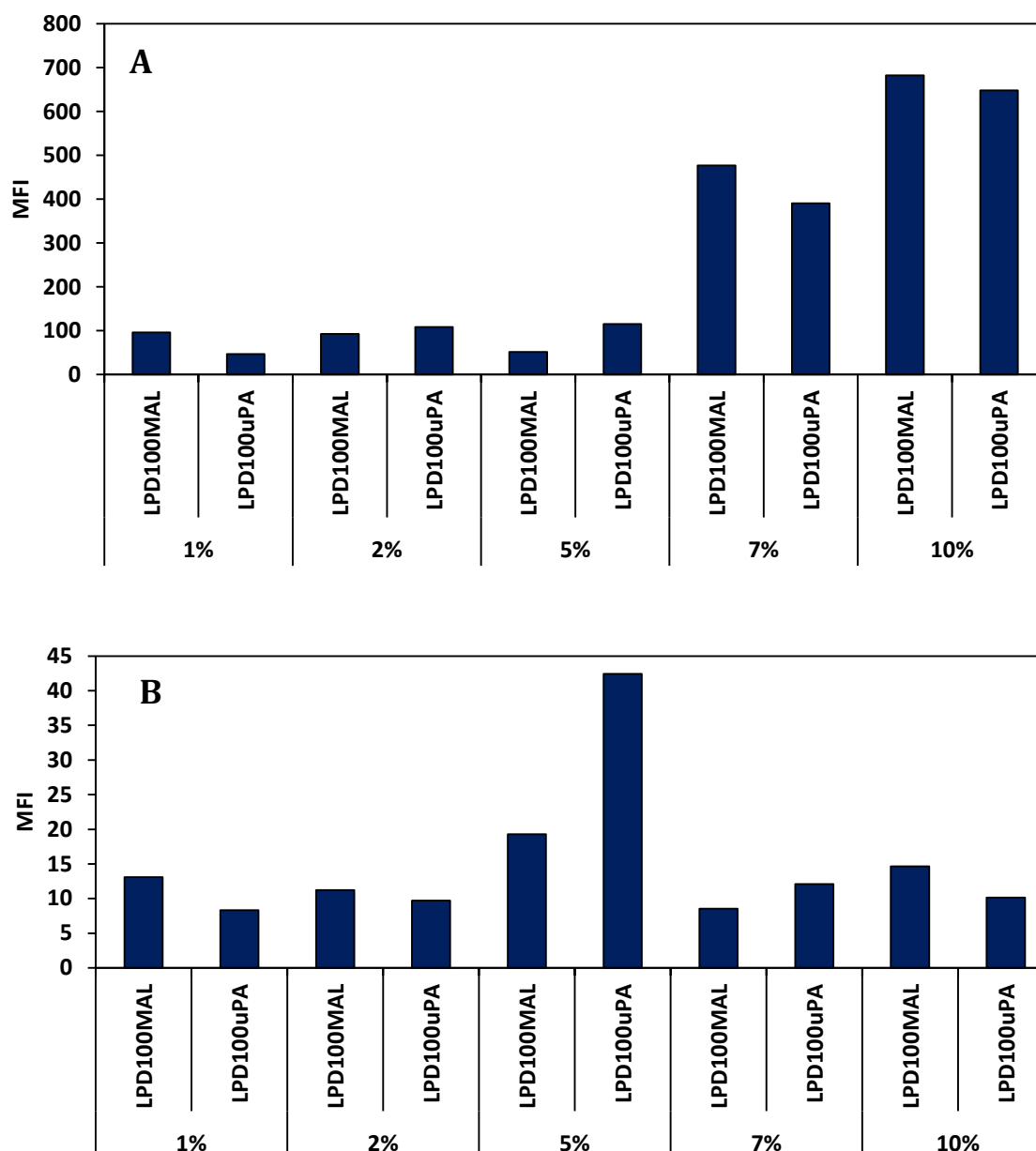


Figure 25: Internalisation par les cellules 4T1, des lipopolyplexes formulés avec différents pourcentage de peptide uPA.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules. Les cellules sont incubées avec les lipopolyplexes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

A la surface des cellules, il n'y a pas de réelle différence d'accumulation entre les LPD100 avec 5% uPA et 2% uPA, respectivement 115 et 108 de MFI (**figure 25A**). Les LPD 100 comportant 7% et 10% de peptide s'accumulent énormément à la surface des cellules. Ceci est dû à leur taille très importante en raison de l'augmentation du nombre de groupements de polyéthylène glycol. En effet, une floculation des liposomes dans le tube est observée à partir de 7%. Ceci peut expliquer l'accumulation en surface. A l'intérieur des cellules, compartiments acides inclus, les résultats confirment que les lipopolyplexes avec

5% de peptide sont ceux qui pénètrent le mieux dans les cellules 4T1 et qui sont meilleurs que les LPD100 sans peptide (**figure 25B**). Les LPD 7 et 10% qui s'accumulent à la membrane par précipitation ne sont pas capables d'être mieux endocytés que les LPD 100 5% uPA.

2. Internalisation par les cellules C2C12

Les liposomes ciblés ont été testés pour leur capacité à améliorer l'endocytose sur d'autres lignées cellulaires. Les cellules C2C12 différenciées, forment des myotubes et sont des cellules musculaires squelettiques difficiles à transfecter. Afin d'améliorer l'internalisation des vecteurs de transfections, nous avons incorporé le peptide ASSLNIA sur Lip100. Au laboratoire, des expériences avec de la sérum albumine bovine fluorescente couplée à ce peptide par son extrémité C-terminale ou N-terminale, *via* l'ajout d'une cystéine ont montré que l'internalisation de la BSA ciblée par le peptide ASSLNIAC est deux fois plus importante que celle de la BSA et de la BSA ciblée par le peptide CASSLNIA (résultats non publiés).

Une cinétique d'endocytose a donc été réalisée en utilisant des liposomes ciblés par les peptides suivants : ASSLNIAC (peptide spécifique attaché sur les liposomes par son extrémité C-terminale), CASSLNIA (peptide spécifique attaché sur les liposomes par son extrémité N-terminale), RGD (peptide de reconnaissance des intégrines $\alpha V\beta 3$) ainsi que le double ciblage ASSLNIAC + RGD (**figure 26**).

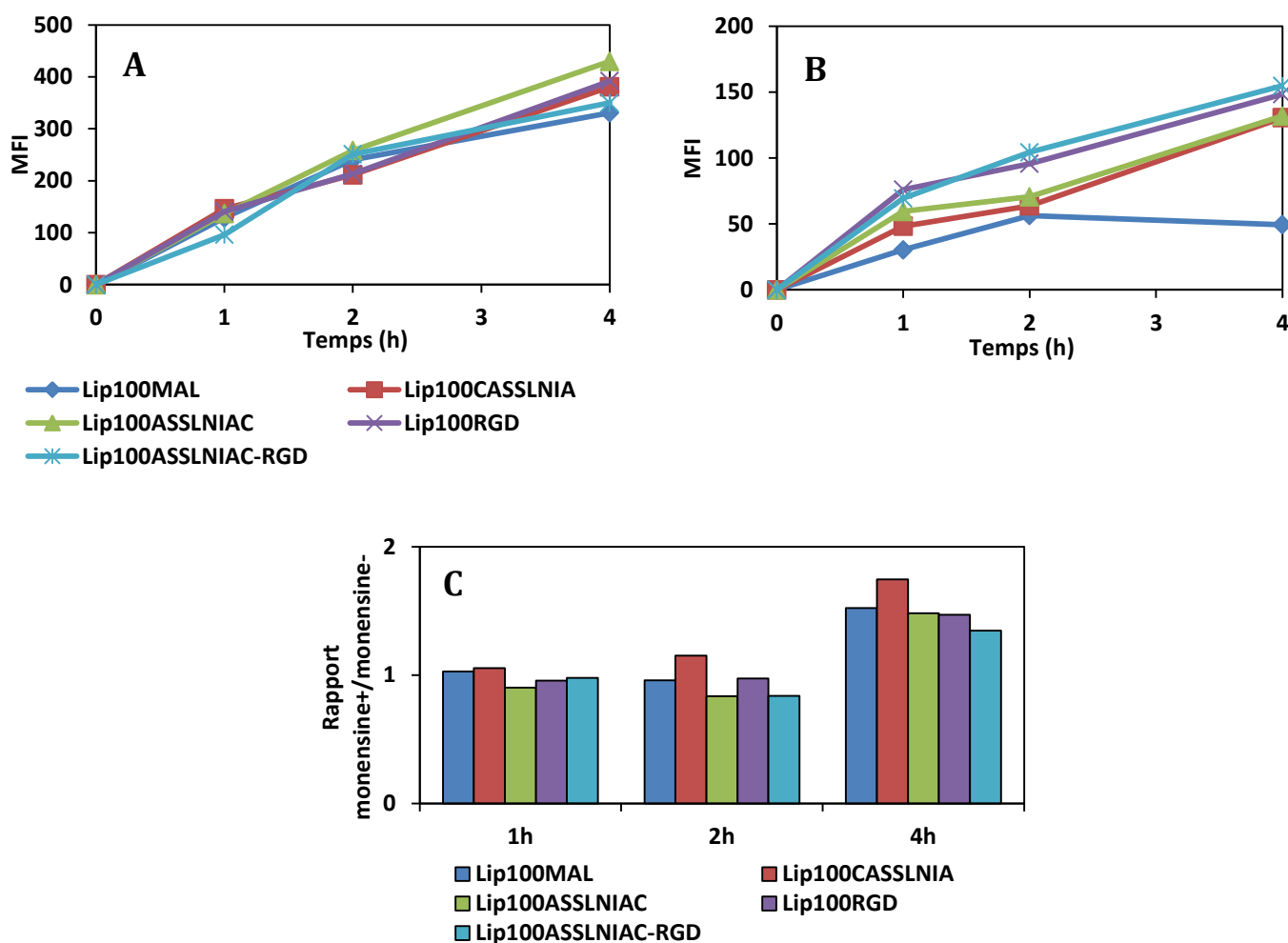


Figure 26: Internalisation des liposomes ciblés sur les cellules C2C12 différenciées.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (fluorescence A-B) ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (fluorescence C) ; C/ Effet monensine (fluorescence C/B). Les cellules sont incubées avec les liposomes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

Les différents liposomes ciblés s'accumulent de la même manière à la surface des cellules C2C12 en fonction du temps (**figure 26A**). La fluorescence associée à la surface des cellules est identique pour chaque type de liposomes alors que la fluorescence associée à l'intérieur des cellules diffère selon les liposomes (**figure 26B**). Après 4h d'internalisation, les liposomes ciblés ASSLNIA, RGD et ceux qui sont doublement ciblés ASSLNIA+RGD sont trois fois plus internalisés que les liposomes non ciblés. Il ne semble pas y avoir de différence entre les liposomes ciblés, quel que soit le sens de fixation du peptide ASSLNIA contrairement à l'endocytose de la BSA ciblée. La BSA est une plus petite molécule que les liposomes, le sens de fixation du peptide peut être plus déterminant que lorsqu'il s'agit des

liposomes. L'effet monensine, (révélateur d'une internalisation dans des compartiments acides) est le même pour tous les vecteurs testés, ce qui laisse supposer que ces liposomes ont la même voie d'endocytose, probablement clathrine dépendante. Cette endocytose des liposomes est assez longue, puisqu'il faut attendre 4h avant de les voir dans les compartiments acides.

Lorsque l'internalisation des LPD sur C2C12 est analysée, les résultats sont assez similaires, la meilleure efficacité d'endocytose est obtenue avec les LPD doublement ciblés ASSLNIA+RGD avec une endocytose deux fois plus importante par rapport aux LPD non ciblés (**figure 27B**). En revanche, sous forme LPD, le peptide RGD seul, ne semble plus apporter de bénéfice pour la fixation en surface et l'endocytose. Le double-ciblage du LPD semble plus apporter un bénéfice pour l'internalisation des nanoparticules. Les intégrines $\alpha V\beta 3$ ciblées par le peptide RGD sont endocytées *via* la voie des clathrines et des cavéolines (Caswell et al., 2009). Elles sont impliquées dans les interactions avec la matrice extracellulaire mais également dans la transduction de signal de l'extérieur des cellules *via* l'intérieur et inversement (Hynes, 2002). Elles interagissent notamment avec les récepteurs des facteurs de croissance. Par exemple, le PDGF en se liant sur son récepteur, peut induire l'internalisation des intégrines $\alpha V\beta 3$ et son recyclage (Woods et al., 2004). Ainsi, après fixation *via* le peptide ASSLNIA, le double ciblage en ajoutant le peptide RGD induirait une endocytose après reconnaissance par les intégrines ce qui n'aurait pas lieu avec le ciblage unique *via* le peptide ASSLNIA.

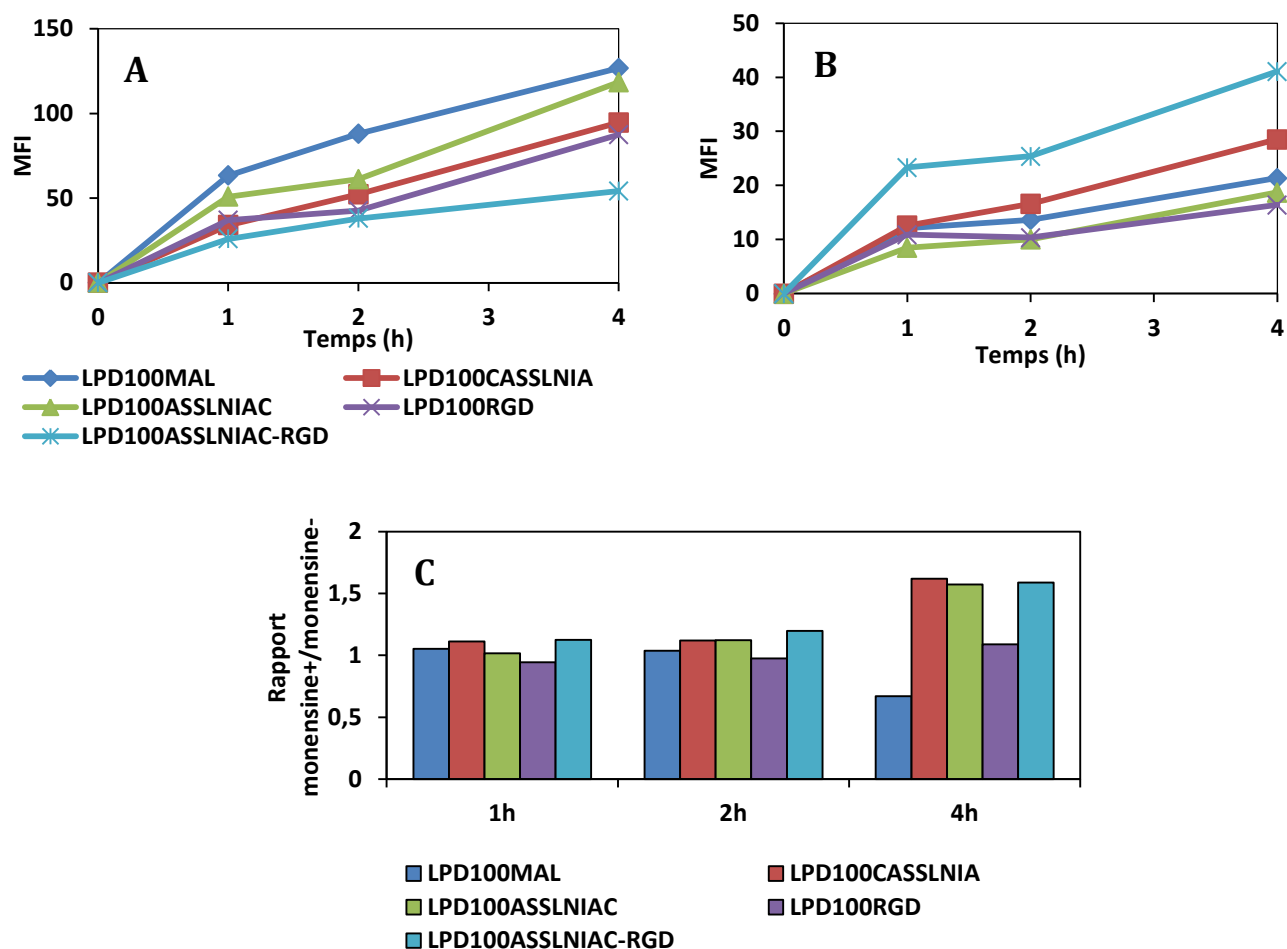


Figure 27: Internalisation des LPD ciblés par les cellules C2C12 différenciées.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (fluorescence A-B) ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (fluorescence C) ; C/ Effet monensine (fluorescence C/B). Les cellules sont incubées avec les lipopolyplexes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

3. Internalisation par les cellules MCEC

Le ciblage des liposomes *via* le peptide RGD qui se fixe aux intégrines $\alpha V\beta 3$ a été testé sur les cellules MCEC, des cellules endothéliales murines qui possèdent à leur surface ces mêmes intégrines. L'endocytose a d'abord été réalisée pour les liposomes (**figure 28**), puis les lipoplexes ADN (**figure 29**).

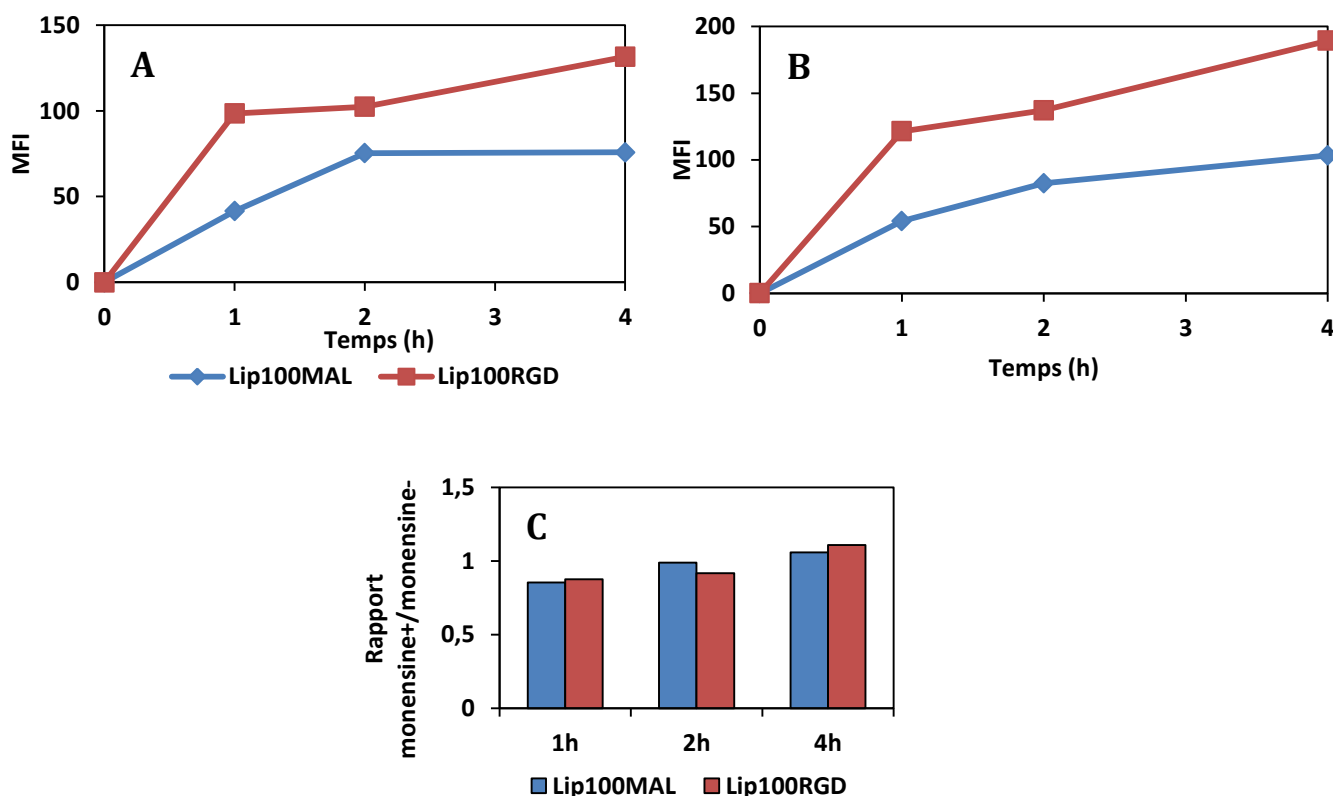


Figure 28: Internalisation des liposomes ciblés par les cellules MCEC.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (fluorescence A-B) ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (fluorescence C) ; C/ Effet monensine (fluorescence C/B). Les cellules sont incubées avec les liposomes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

Lip100RGD s'accumule de manière plus rapide et plus importante à la surface cellulaire (MFI: 171,5) que Lip100MAL (MFI 75,8) (**figure 28A**). Lip100RGD est également plus présent à l'intérieur des cellules mais ne se trouve pas dans les compartiments acides (**figure 28B**) puisqu'il n'y a quasiment pas d'effet monensine (rapport monensine+/- : 1,1) (**figure 28C**). Cette même étude a été effectuée avec les lipoplexes (**figure 29**).

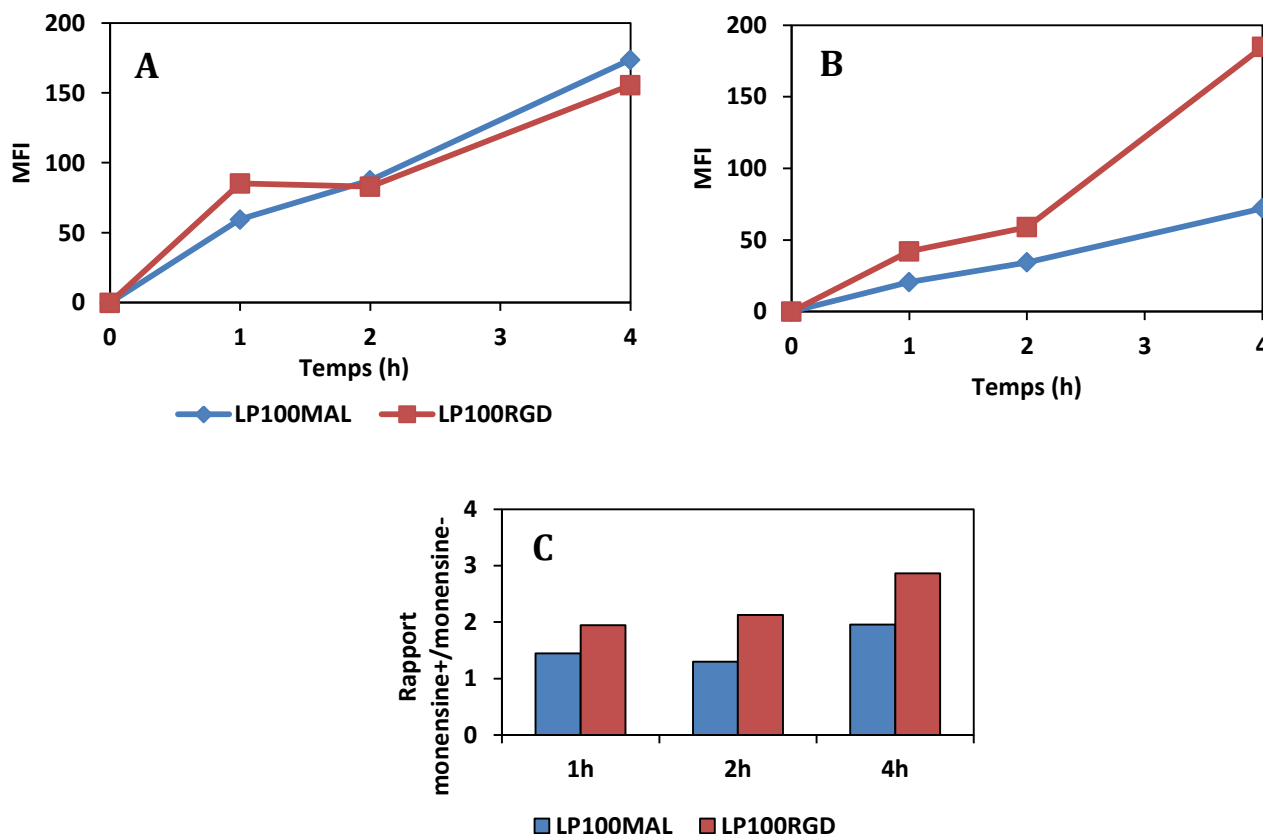


Figure 29: Internalisation des lipoplexes (LP) ciblés par les cellules MCEC.

A/ Fluorescence associée à la surface cellulaire (fluorescence A-B) ; B/ Fluorescence totale à l'intérieur des cellules (fluorescence C); C/ Effet monensine (fluorescence C/B). Les cellules sont incubées avec les lipoplexes durant différents temps, puis la fluorescence associée est analysée par cytométrie en flux. La moyenne de l'intensité de fluorescence est réalisée sur 5000 cellules.

Concernant l'accumulation à la surface cellulaire, sous forme lipoplexe, il n'y a pas de différence entre le ciblé et le non ciblé (**figure 29A**). Cependant, à l'intérieur des cellules LP100RGD s'accumulent presque trois fois plus à 4h (**figure 29B**). L'augmentation de la fluorescence après traitement par la monensine indique que c'est une endocytose clathrine dépendante (**figure 29C**). L'effet monensine est différent lorsque l'on compare l'endocytose des liposomes avec celle des lipoplexes. Les lipoplexes ciblés par le peptide RGD ont une meilleure efficacité d'endocytose dans les cellules MCEC en comparaison aux lipoplexes non ciblés.

Les intégrines $\alpha V\beta 3$ peuvent être endocytées par la voie clathrine-dépendante, mais il a également été démontré que dans les cellules endothéliales, les intégrines $\alpha V\beta 3$ peuvent aussi transiter *via* la voie de la cavéoline. Ceci a été montré *via* l'endocytose de la metalloprotéinase MT1-MMP dans des cellules HUVEC (Gálvez et al., 2004).

L'internalisation des liposomes ne montre pas d'effet monensine et ceci après 4h d'internalisation. Ceci pourrait s'expliquer par leur prise en charge par une endocytose caveoline dépendante, ce qui nécessiterait plus de temps pour rejoindre les vésicules acides.

Dans cette étude, les liposomes ciblés sont préparés en greffant les peptides après formation des liposomes. Leur reconnaissance par les récepteurs de surface n'est pas effectuée de la même manière en fonction des types de complexes avec les acides nucléiques. Comme dit précédemment, ceci peut s'expliquer par une exposition différente du peptide selon ces complexes. Pour améliorer le ciblage, il serait préférable d'incorporer le peptide après formation des lipoplexes ou des lipopolyplexes afin d'optimiser leur distribution à la surface des complexes pour une meilleure reconnaissance. En utilisant comme méthode de greffage la réaction maléimide-thiol, il est nécessaire de mettre en réaction un excès de peptide de ciblage (5 excès) afin de s'assurer de l'efficacité de la réaction. Cet excédent de ligand doit ensuite être éliminé. Or, la purification de lipoplexes ou de lipopolyplexes risque de conduire à la dégradation de l'acide nucléique. De plus ces complexes sont des équilibres supramoléculaires qui peuvent être modifiés au cours de leur purification.

Afin de réaliser un greffage de ligand de ciblage directement sur les complexes, il faudrait une réaction de couplage qui s'effectuerait en milieu aqueux, à pH neutre avec un très bon rendement, quasiment à équimolarité et qui donc ne nécessiterait aucune purification ultérieure. La chimie click ou click chemistry pourrait répondre à cet objectif.

4. Click-chemistry

La click chemistry permet une cycloaddition azide-alcyne (SPAAC) entre une molécule possédant une fonction alcyne et une autre molécule possédant une fonction azide (Agard et al., 2004). Cette réaction nécessite l'utilisation de cuivre et d'acide ascorbique afin de catalyser la réaction (CuAAC) (Said Hassane et al., 2006). Cependant, le cuivre est toxique et difficile à éliminer ce qui limite son utilisation avec les cellules et

surtout les acides nucléiques sensibles au cuivre. Une nouvelle génération de molécule a été développée avec des groupes alcyne de type cyclooctyne dont le groupe DBCO (dibenzocyclooctyl), qui ne nécessite pas de cuivre pour la réaction de cycloaddition avec une fonction azide (**figure 30**). Cette réaction s'effectue en équimolarité et ne nécessite donc pas d'excès de ligand. Des lipides possédant la fonction DBCO sont désormais commercialisés.

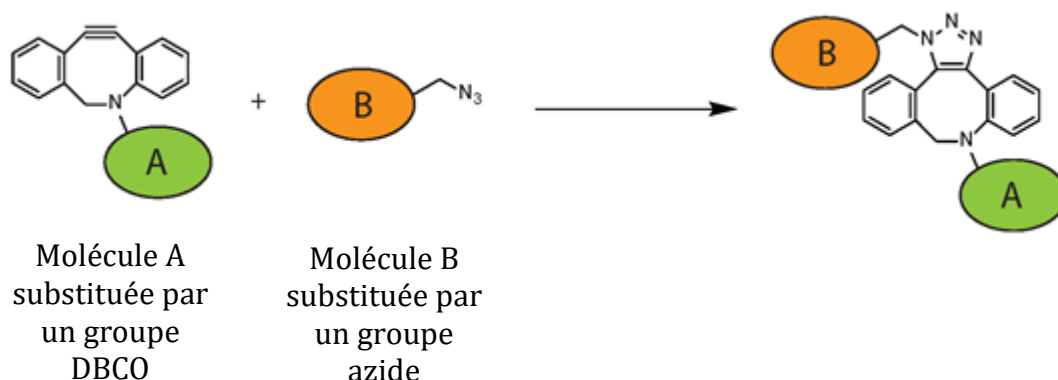


Figure 30. Réaction de cycloaddition entre un groupement A avec DBCO et un groupement B avec azide. (Baskin et al., 2007).

Nous avons utilisé le lipide DSPE-PEG2000-DBCO comprenant le groupe dibenzocyclooctyl (DBCO) à l'extrémité d'une molécule PEG de 2000 Da pour l'incorporer dans la formulation initiale de Lip100 (Lip100DBCO) (**figure 31**).

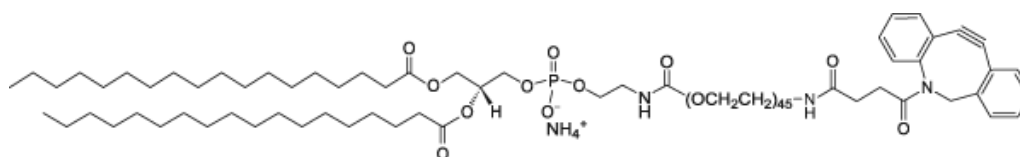


Figure 31: Formule chimique du DSPE PEG 2000 DBCO.

Afin de suivre l'efficacité de la méthode avec Lip100DBCO, un dérivé azido de la fluorescéine, le 5-FAM-Azide a été utilisé comme ligand (**figure 32**). Ce ligand a été choisi car son couplage avec les liposomes peut être suivi par cytométrie en flux.

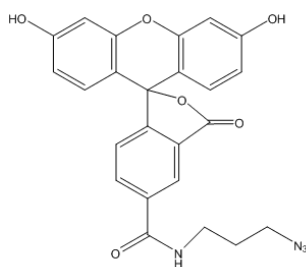


Figure 32: Formule chimique du click 5-FAM azide.

Dans un premier temps, des liposomes Lip100DBCO contenant le lipide DBCO ou des lipopolyplexes LPD100DBCO contenant un plasmide ADN ont été mélangés avec différentes quantités de 5-FAM-Azide (**figure 33**). Le résultat de la réaction a été évalué en analysant les liposomes et les lipopolyplexes par cytométrie en flux.

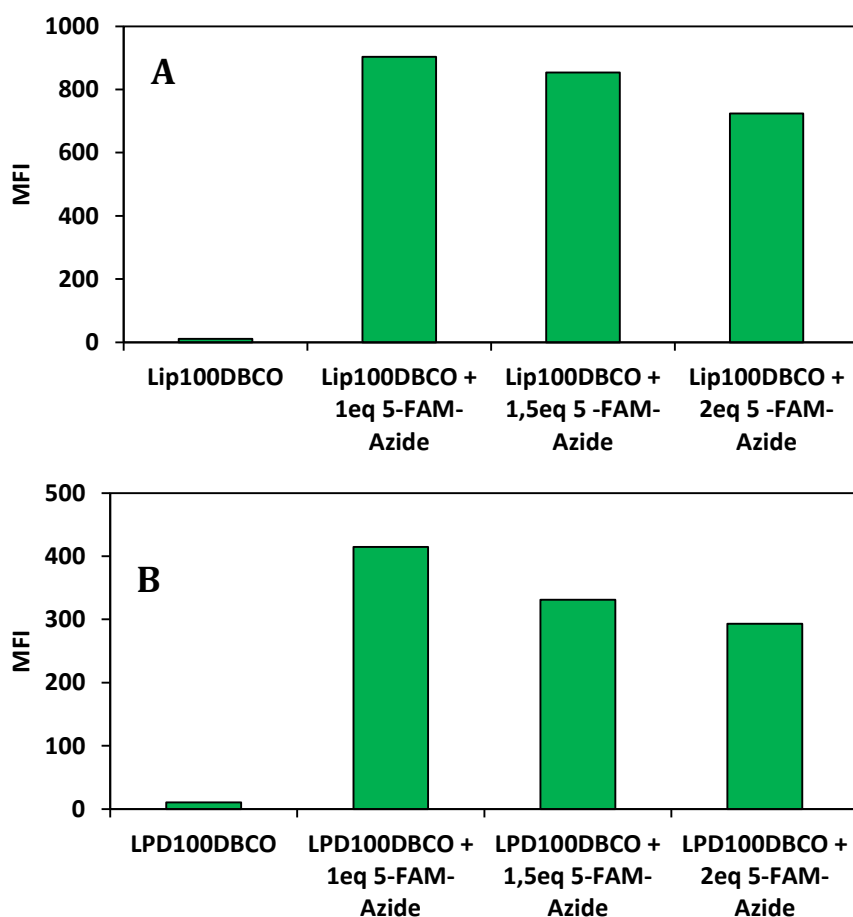


Figure 33: Optimisation du couplage du 5-FAM-Azide sur A/ les liposomes Lip100DBCO ou B/ des LPD100DBCO.

Les liposomes ou les LPD100 dans le tampon 10 mM HEPES à pH 7,4 ont été mélangés durant 4h à température ambiante sous agitation légère avec différents équivalents molaires de 5-FAM-Azide dilué dans le même tampon. L'intensité de fluorescence (MFI) des liposomes et des lipopolyplexes a ensuite été mesurée par cytométrie en flux sur une moyenne de 10 000 particules.

L'ajout d'un seul équivalent de 5-FAM-Azide avec les liposomes permet d'obtenir la plus forte fluorescence des liposomes (**figure 33A**). L'ajout d'un équivalent supplémentaire de 5-FAM-Azide n'améliore pas la fluorescence des liposomes et diminue même celle-ci. L'augmentation du nombre de molécules fluorescentes pourrait conduire à une diminution de la fluorescence par un phénomène d'extinction partielle de la fluorescence entre les fluorophores. Ceci voudrait dire que la fixation n'est pas totale avec un équivalent mais qu'elle permet d'avoir une fluorescence maximale.

La même expérience a été réalisée en ajoutant le 5-FAM-Azide après la formation des lipopolyplexes (**figure 33B**). La fluorescence maximale est également obtenue en ajoutant seulement 1 équivalent de 5-FAM-Azide. Comme avec les liposomes et pour la même raison, l'augmentation du nombre d'équivalents 5-FAM conduit à une diminution de la fluorescence des LPD. Nous pouvons constater que la MFI maximale avec les liposomes (903) (**figure 33A**) est deux fois plus forte que celle obtenue avec les LPD (414) (**figure 33B**). Ceci suggère que le lipide DBCO à la surface des LPD est moins accessible ou en nombre moindre qu'à la surface des lipopolyplexes. Cette constatation irait dans le même sens que les hypothèses émises pour expliquer les différences que nous avons obtenues avec les liposomes, les lipoplexes et les lipopolyplexes ciblés. Dans l'optique d'un couplage d'une molécule ciblant, cette technique permettrait d'obtenir un couplage optimal de la molécule à la surface du LPD favorisant ainsi la reconnaissance du LPD par le récepteur souhaité.

Une autre optimisation a été réalisée en faisant varier le temps d'incubation tout en gardant l'ajout d'un équivalent molaire de 5-FAM-Azide (**figure 34**). Le couplage du 5-FAM-Azide a été réalisé en parallèle sur Lip100DBCO et sur Lip100PEG qui ne contient pas de groupe DBCO. Un bruit de fond dû à une absorption du fluorophore sur les liposomes est observable. Cependant la fixation du 5-FAM-Azide sur Lip100DBCO est obtenue avec une meilleure efficacité en incubant pendant 1h. Une incubation plus longue n'améliore pas l'intensité du couplage.

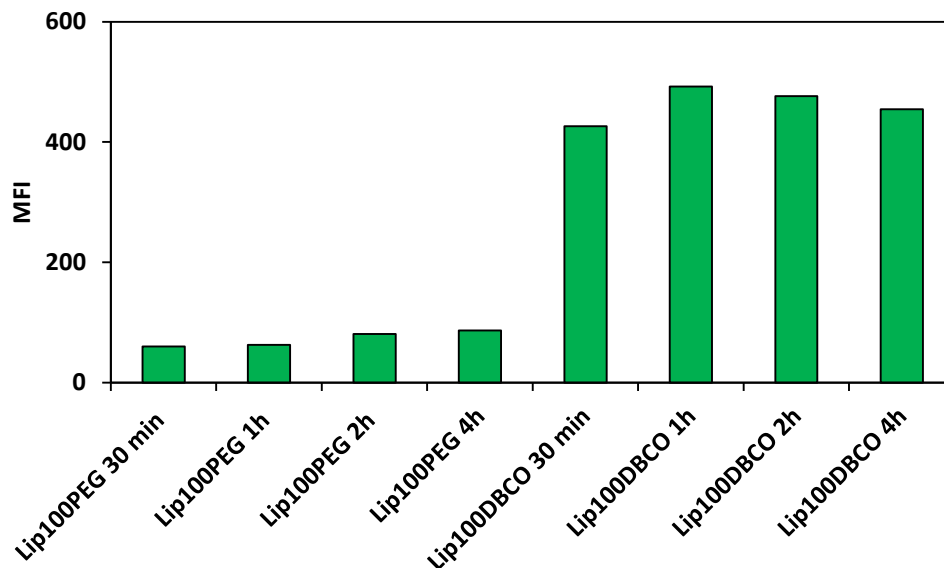


Figure 34: Optimisation du couplage du 5-FAM sur les liposomes Lip100DBCO en fonction du temps d'incubation.

Un équivalent molaire de 5-FAM-Azide dilué dans l'HEPES a été incubé avec Lip100DBCO durant différents temps à température ambiante sous agitation légère. L'intensité de fluorescence des liposomes a ensuite été mesurée par cytométrie en flux sur une moyenne de 10 000 liposomes.

Enfin, une comparaison a été effectuée entre un couplage sur des lipoplexes ADN et des lipoplexes siRNA. Le couplage du 5-FAM a été réalisé durant 4h en incubant 1 équivalent molaire (**figure 35**). Comme le montre les résultats de MFI, le couplage est trois fois plus efficace sur les lipoplexes siRNA que sur les lipoplexes ADN. Cela suppose que le lipide DBCO serait moins accessible au 5-FAM-Azide dans ces derniers.

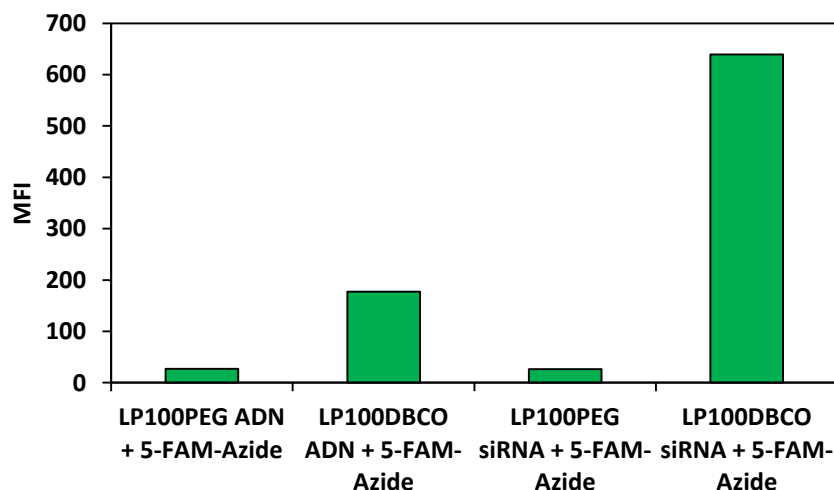


Figure 35: Comparaison de l'efficacité de couplage du 5-FAM azide sur des lipoplexes ADN et des lipoplexes siRNA.

Un équivalent molaire de ligand 5-FAM-Azide a été incubé avec les lipoplexes durant 1h à température ambiante sous agitation légère. L'intensité de fluorescence des lipoplexes a ensuite été mesurée par cytométrie en flux sur une moyenne de 10 000 lipoplexes.

Cette méthode est donc très efficace et pourrait être utilisée pour coupler un peptide comme ceux que nous avons utilisés plus haut sur des liposomes, des lipoplexes ou les lipopolyplexes contenant de l'ADN ou des siRNA. Elle permet d'ajouter le peptide azide de ciblage après formation des complexes ce qui maximiserait la présence du peptide de ciblage en surface des particules. De plus, le couplage ne nécessiterait pas d'excès de peptide azide, cette réaction s'effectuerait en un temps réduit (1h) et ne nécessiterait pas de purification des particules d'acides nucléiques avant leur utilisation sur des cellules ou injection à des souris.

D. Efficacité biologique des lipopolyplexes siRNA ciblés

Les liposomes ciblés ont été utilisés afin de délivrer spécifiquement des siRNA dans les cellules 4T1 exprimant stablement le gène de la luciférase. Afin de mesurer l'efficacité d'inhibition de l'expression de la luciférase, des siRNA dirigés contre l'ARNm de la luciférase sont formulés en lipopolyplexes en utilisant les différents liposomes ciblés testés précédemment en endocytose. L'efficacité de l'inhibition de la luciférase a été mesurée 48h post-transfection (**figure 36**).

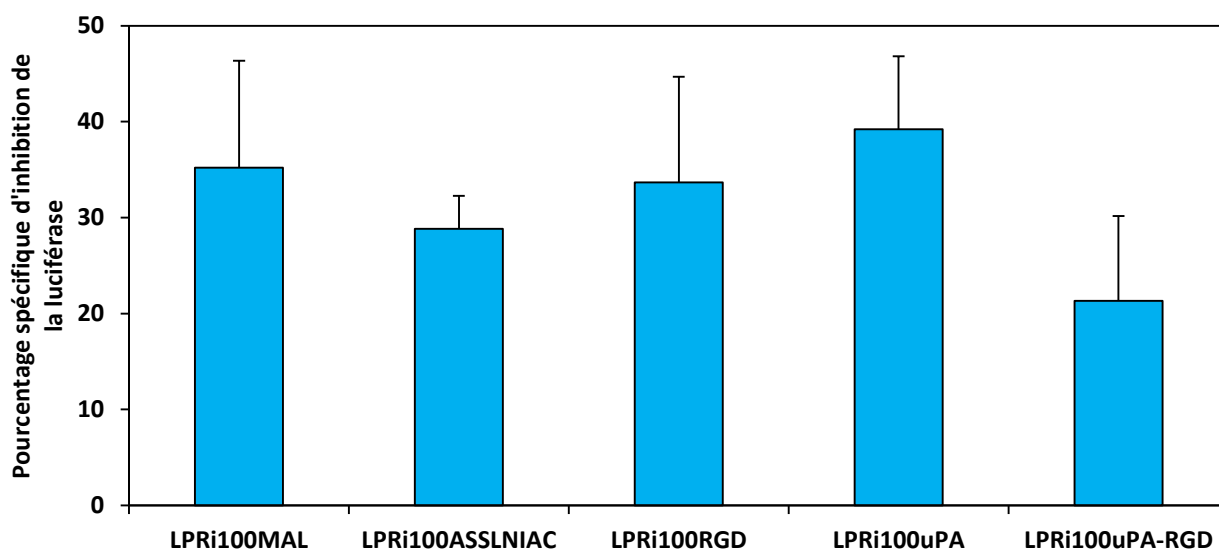


Figure 36: Inhibition spécifique de la luciférase par les LPRi ciblés contenant 50 nM de siRNA anti-luciférase.

Les cellules 4T1-Luc ont été transfectées pendant 24h en absence de sérum avec les lipopolyplexes-siRNA. Le milieu des cellules est ensuite remplacé par du milieu de culture complet et les cellules sont incubées pendant 24h. L'activité luciférase est mesurée 48 post-transfection et normalisée par un dosage protéine. Le pourcentage inhibition spécifique de la luciférase est exprimé par rapport aux cellules non traitées après retrait de l'inhibition induite par les siRNA scramble.

Les LPRi100MAL, sans peptide de ciblage permettent une inhibition spécifique de 35%. Cette inhibition est nettement moins importante en comparaison à l'inhibition induite par les LPRi100 dans les mêmes conditions (84% d'inhibition) (page 91) (**figure 36**). Ceci est dû à la présence des groupements de PEG sur les LPRi100MAL qui rendent les lipopolyplexes beaucoup moins cationiques et qui interagissent donc moins avec la membrane cellulaire avec comme potentiel ζ des LPRi100MAL : 27 mV et des LPRi100 : 84mV (Gonçalves et al., 2014). Les LPRi100ASSLNIAC (peptide non spécifique) n'apportent pas de bénéfice (28% inhibition), de même que les LPRi100RGD (33%) et les LPRi doublement ciblés uPA-RGD (21%). Les LPRi100uPA, les lipopolyplexes ciblés par le peptide spécifique des cellules 4T1 n'apportent qu'une légère amélioration de l'inhibition de la luciférase (39%). Néanmoins, si cette inhibition est comparée aux LPRi100ASSLNIAC qui sont les lipopolyplexes ciblés contrôles normalement non reconnus par les cellules 4T1, cette amélioration de l'inhibition de la luciférase deviendrait significative. Bien qu'une amélioration de l'endocytose de ces lipopolyplexes avec ADN ait été mesurée par cytométrie en flux, les résultats de l'endocytose de ces lipopolyplexes avec siRNA ont été moins nets. De plus, les groupements de polyéthylène glycol présents dans les lipopolyplexes ciblés peuvent inhiber l'échappement endosomal en diminuant la fusion membranaire entre les nanoparticules et les endosomes ce qui mènerait les complexes vers les lysosomes (Chan et al., 2012).

La viabilité cellulaire des 4T1 a été également mesurée afin de vérifier que l'inhibition de la luciférase n'est pas due à des effets de cytotoxicité (**figure 37**). Les résultats montrent que la viabilité cellulaire est quasiment la même peu importe le LPRi employé. La viabilité cellulaire des 4T1 se situe dans les 80-90% dans tous les cas. L'inhibition de la luciférase est donc bien due à l'effet spécifique des siRNA anti-luciférase.

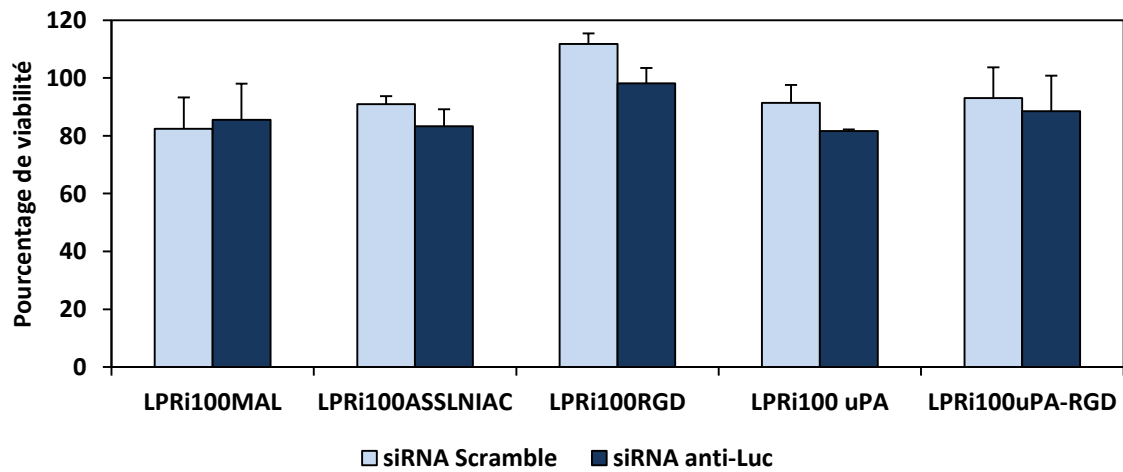


Figure 37: Viabilité cellulaire 48h post-transfection des LPRi ciblés 50 nM siRNA.
Après 48h de transfection, la viabilité est mesurée par un test MTT et le pourcentage de viabilité est exprimé en fonction des cellules non traitées.

Le ciblage des cellules 4T1 *via* le peptide uPA apporte une meilleure endocytose des lipopolyplexes-ADN (**figure 23**), ainsi qu'une amélioration de l'inhibition de la luciférase lors de la transfection de 50nM de siRNA anti-luciférase dans des cellules 4T1-Luc. Cependant, ces améliorations demeurent assez faibles. Il est à noter que l'efficacité des siRNA ne dépend pas seulement de la quantité internalisée mais de la qualité de la délivrance cytosolique des siRNA en particulier dans le complexe RISC.

Nous nous sommes tournés vers un autre type de ciblage des cellules 4T1 en utilisant l'acide folique (FA) reconnu par son récepteur FR (Folate Receptor). Celui-ci est trouvé surexprimé dans certaines lignées tumorales, ce qui est le cas pour les cellules 4T1 (Krystofiak et al., 2012).

La fixation du ligand folate permet de déclencher l'endocytose clathrine dépendante de ce récepteur. L'acide folique est ensuite délivré dans le cytosol alors que le récepteur est recyclé à la membrane plasmique. Les lipopolyplexes ciblés par du folate pourraient bénéficier de cette internalisation dans les cellules 4T1.

III. Co-délivrance de siRNA anti-STAT3 et de leurres moléculaires anti-STAT3 par les lipopolyplexes

A. Co-délivrance de siRNA anti-STAT3 et de leurres moléculaires anti-STAT3 par les lipopolyplexes *in vitro*

Dans le but d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses 4T1, nous avons décidé de délivrer des siRNA dirigés contre le facteur de transcription STAT3. Ce facteur est surexprimé dans différents cancers y compris le cancer du sein. Il influe sur différents processus telle la prolifération, l'invasion et l'inhibition de l'apoptose *via* l'activation de la transcription de plusieurs gènes comme la survivine, twist ou encore Bcl-xL (Akira S., 2000; Levy and Darnell, 2002).

Afin de délivrer ces siRNA dans les cellules 4T1, nous avons utilisé la formule optimisée précédemment de HislPEI-LPRi100 (LPRi100). Cette formulation a permis l'inhibition de 84% de la luciférase après transfert de 50 nM de siRNA anti-Luc dans la lignée cellulaire 4T1-Luc. Nous avons par la suite développé une formulation ciblée contre ces cellules en utilisant le folate dont le récepteur est surexprimé. Ces LPRi ont été testés pour leur efficacité de transfection et d'endocytose par cytométrie en flux en suivant des siRNA marqués par la fluorescéine.

L'incorporation de 2% de DSPE-PEG2000 Folate permet une inhibition spécifique de 54% de la luciférase. Cette inhibition n'est pas améliorée après l'incorporation d'une plus grande quantité de Folate. L'endocytose de ces nanoparticules est également meilleure en comparaison aux LPRi non ciblés.

Par la suite, les LPRi non PEGylés et non ciblés ont été utilisés afin de délivrer des siRNA anti-STAT3 dans les cellules 4T1. Cependant, malgré l'inhibition de l'ARNm de STAT3 de 85% et l'inhibition totale de la protéine, aucun effet sur la prolifération cellulaire n'a été mesuré. Par conséquent, nous avons décidé de co-délivrer, pour la première fois, des siRNA et des leurres moléculaires, tous deux dirigés contre STAT3, formulés par les lipopolyplexes. Cette co-délivrance a permis l'inhibition de l'ARNm de STAT3 ainsi que l'inhibition complète de la protéine STAT3 et sa forme phosphorylée. De plus, seule la co-

délivrance permet d'inhiber une cible de STAT3, la protéine Bcl-xL. Enfin, la co-délivrance des siRNA et des leurres moléculaires a permis de diminuer la prolifération cellulaire et de faire entrer 35% des cellules en apoptose.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article : Cell proliferation inhibition by co-delivery of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA Decoy in 4T1 cells with lipopolyplexes.

**Cell proliferation inhibition by co-delivery of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA
Decoy in 4T1 cells with lipopolyplexes.**

Marie-Pierre Gosselin, Geoffrey Casas, Jean-Marc Malinge, Patrick Baril, Chantal Pichon,
Patrick Midoux

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Inserm and University of Orléans, F-45071, Orléans cedex 02, France.

*to whom correspondence should be addressed: Patrick.midoux@cnrs-orleans.fr

Key words: siRNA; DNA molecular decoy; STAT3; cationic lipid; cationic polymer; histidine; folate.

Abstract

Small interfering RNAs (siRNAs) and DNA decoys are promising therapeutics for cancer treatment. Nevertheless, these small nucleic acids need carriers to achieve specific cancer cell recognition and intracellular delivery. We show that lipopolyplexes (LPR) – liposomes/polymer/nucleic acids ternary complexes - is an efficient formulation for functional delivery of siRNA, DNA decoy or both in 4T1 mammary carcinoma cells. A strong efficiency (~80% at 50 nM siRNA) was reached with LPR containing anti-Luc siRNA for inhibition of luciferase activity in dose-dependent manner both at the protein and mRNA level in 4T1-Luc stably expressing luciferase. Similarly, 85% and 100% of STAT3 mRNA and STAT3 were inhibited by 65 nM anti-STAT3 siRNA in 4T1 cells, respectively. Although folate-PEG-LPR were less efficient than folate-PEG-free LPR, a better siRNA internalization was obtained by incorporation of 2% DSPE-PEG2000-Folate in the liposomes. At the same concentration, anti-STAT3 DNA decoy was clearly more efficient than anti-STAT3 siRNA (80% *versus* 10%) to inhibit cell proliferation *in vitro* over 72 h post-transfection. Despite the weak effect of siRNA, its co-delivery with the DNA decoy induced an unexpected non-additive increased apoptosis of 4T1 cells compared to the DNA decoy alone suggesting synergy between siRNA effect and DNA decoy effect. Despite no clear mechanistic explanation yet, this strong anti-proliferative effect after siRNA and DNA decoy co-delivery opens pre-clinical applications.

1. Introduction

Despite considerable advances in Research Science and Medicine, cancer remains the most common cause of death in industrialized countries. Techniques allowing molecular analysis on a large scale identify therapeutic targets and molecules that should improve the development of targeted molecular therapies acting on cellular modifications involved in cancer and metastases development. Among these therapies, small nucleic acids like small interfering RNAs (siRNAs) and DNA molecular decoys are promising therapeutics. Since their discovery, RNA interference have demonstrated powerful capacity to regulate gene expression at post-transcriptional level (Fire et al., 1998; Yeung et al., 2005). SiRNAs are double-stranded synthetic RNA of 22 nucleotides in which the antisense or guide strand after incorporation in the RISC complex, is directed to the target mRNA and hybridized with the complementary sequence leading to mRNA degradation or translation blockade ending to inhibition of protein expression. SiRNA-based drugs are being developed for the reduction the overexpression of oncogenes and genes responsible for tumor progression (Burnett and Rossi, 2012). DNA molecular decoys were discovered in 1990 and first used to study gene expression in differentiation (Bielinska et al., 1990). The said strategy of the DNA molecular decoy is using linear double-stranded oligodeoxyribonucleotides of 20 base pairs containing the recognition site of a target transcription factor regulating at the pre-transcriptional level the transcription of genes involved in cancer. This strategy has been used to block transcription factors identified as therapeutic targets in cancer (Libermann and Zerbini, 2006; Gambari, 2011; Sen and Grandis, 2012). A DNA molecular decoy captures the transcription factor either in the cytosol or nucleus which is no longer capable of interacting with the DNA sequence present in the promoter region of many genes whose transcription and expression are involved in cancer. It is important to note that recent results also showed the importance of

transcription factors in the regulation of transcription of microRNAs involved in cancer (Wang et al., 2010). This strategy has been used to trap the transcription factor STAT3 which is directly involved in regulating many cellular processes including proliferation, postnatal survival, oncogenesis, and breast cancer metastasis (Akira S., 2000; Levy and Darnell, 2002). Constitutively activated STAT3 enhances metastasis of mammary tumors, and a STAT3 knockdown blocks breast cancer cell migration and metastasis (Barbieri et al., 2010). Anti-STAT3 DNA molecular decoy were found to induce *in vitro* both the decrease of the oncogene Bcl-xL and of the proliferation of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells (Leong et al., 2003). Proof of principle was also made in other cancer cell lines including lung, ovarian, colon adenocarcinoma, and breast cancer (Zhang et al., 2007, 2010; Souissi et al., 2011). Anti-STAT3 DNA molecular decoy entered clinical trial in 2012 (#NCT00696176) and was administrated in HNSCC patients to evaluate its pharmacodynamic effects (Sen et al., 2012). Anti-STAT3 DNA molecular decoy was delivered by intratumoral injection and compared to saline control. Results showed no toxicity and a decrease in expression of genes linked to STAT3 such as Bcl-xL and cyclin D1. For a specific cancer cell recognition and intracellular delivery, these small nucleic acids need association with carriers. SiRNAs can be functionalized with peptides, sugars, cholesterol, antibodies ... or incorporated in nanoparticulate complexes with cationic liposomes or cationic polymers such as those used for gene delivery (Burnett and Rossi, 2012). For instance, siRNA complexed with the cyclodextrin-containing cationic polymer called CALAA-01 were well tolerated in a phase Ia/Ib and demonstrated inhibition efficiency in animal solid tumors models (Zuckerman et al., 2014). However, still no molecule has received an approval.

In this study, we have used lipopolyplexes - ternary complexes comprising cationic liposomes, a cationic polymer and nucleic acids - to formulate siRNA and DNA molecular

decoy. Both liposomes and the polymer used contained protonable groups (secondary amino and imidazole groups) that favor nucleic acids delivery in the cytosol after membrane destabilization of endosomes *via* an increased fusogenicity of liposomes and *via* a proton sponge effect mediated by the polymer in acidic medium. This formulation was shown to be attractive for siRNA delivery compared with those formulated with commercial transfection reagents (Gonçalves et al., 2014). Here, lipopolyplexes were also decorated with folate (FA) to confer tumor cell specificity. STAT3 was selected as the therapeutic target for the murine mammary tumor 4T1. It has been shown that STAT3 is a transcription factor involved in the development of the 4T1 primary tumor (Dai et al., 2011) and its metastatic development *via* the up regulation of the transcription of the gene encoding the transcription factor Twist1 (Ling and Arlinghaus, 2005), playing a major role in the metastatic process (epithelial-mesenchymal differentiation) (Foubert et al., 2010). We used anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA molecular decoy to inhibit STAT3 at pre- and post-transcriptional level and examined effect on the proliferation of 4T1 cells in culture.

2. Material and Methods

2.1. Reagents

All reagents were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) unless otherwise stated. Linear polyethylenimine grafted with 16% histidine residues (His-lPEI; Mw = 34.5 kDa) was synthesized as described (Bertrand et al., 2011) and produced by Polytheragene (Genopole, Evry, France). O,O-dioleoyl-N-[3N-(N-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate (KLN25; Mw = 787 Da), O,O-dioleoyl-N-histamine phosphoramidate (MM27; Mw = 692 Da) were produced by Prof P-A Jaffrès and Dr. M.

Berchel (CEMCA, CNRS UMR 6521, IFR148 ScInBioS, UBO, Brest, France) as described (Mevel et al., 2008a and Mevel et al., 2008b).

2.2. Liposomes

Lip100 (KLN25/MM27) were prepared by mixing 0.5 mL of 5.4 mM KLN25 in ethanol with 0.5 mL of 5.4 mM MM27 in ethanol. Lip100 5% PEG were prepared by adding 5% mol of DSPE-PEG2000 (Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, Alabama). Lip100 0.5%, 1% and 2% FA were prepared by adding respectively 0.5%, 1% and 2% mol of DSPE-PEG2000-Folate (Avanti Polar Lipids, Inc) and 4.5%, 4% and 3% of DSPE-PEG2000. Then, ethanol solutions were evaporated to create a film. These films were hydrated for 12h at 4°C in 0.5 mL of 10 mM Hepes buffer, pH 7.4 (HEPES), vortexed and sonicated for 10 min at 37 kHz using a Bioblock, ultrasonic bath (Bioblock Scientific, Illkirch, France). For *in vivo* use, liposomes were hydrated in 10 mM Hepes 60mM NaCl 5% glucose.

2.3. siRNA and molecular decoy

siRNA were designed and purchased from GE Dharmacon. Sense sequences of scramble siRNA, anti-LucGL4 siRNA and anti-STAT3 siRNA were 5' AUGUCUACUGGCAGUCCUGTT 3', 5' GGACGAGGACGAGCACUUCTT 3' and 5' GGACGACUUUGAUUUCAACTT 3', respectively. Fluorescein-labeled siRNA was purchased from Eurogentec and had the same sense sequence as anti-LucGL4 siRNA. DNA oligonucleotides were purchased from Eurogentec. The STAT3 decoy oligonucleotide sequence was 5'-CATTTCCCGTAAATC-3' 3'-GTAAAGGGCATTTAG-5' and the STAT3 mutant control oligonucleotide was 5'- CATTTCCCTTAAATC-3' 3'-GTAAAGGGAATTTAG-5' and the first and last three bases in each strand were phosphorothioated (the binding consensus sequence of STAT3 protein is in italics). Complementary oligonucleotide strands were

annealed in 1X Dharmacon buffer containing 60 mM KCl, 0.1 mM MgCl₂, 6mM Hepes KOH pH 7.5 at a final concentration of 10 μ M in DNA duplex.

2.4. Cell line and cell culture

The 4T1 mammary carcinoma cell line, an animal stage IV human breast cancer, was obtained from ATCC (ATCC® CRL-2539™, Rockville MD, USA). 4T1-Luc cell line was obtained using a lentivirus. Briefly, supernatant containing 10⁶ viral particles and polybrene at a final concentration of 10 μ g/mL were incubated on 10⁵ plated 4T1 cells during 24h at 37°C 5% CO₂. Then cells were selected using 10 μ g/mL puromycin. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. 4T1-Luc cells were cultured in the presence of 2 μ g/mL of puromycin.

2.5. Complexes preparation

All lipopolyplexes were prepared at 3.5 charge ratio N/P (nitrogen/phosphate). LPRi containing 50 nM siRNA were prepared as followed. Five μ L of 5 μ M siRNA were diluted in 2.1 μ L of HEPES. Then, polyplexes were formed by adding 2.1 μ L of 0.5 mg/mL PTG1 in the siRNA solution (N/P ratio of 2.4). After 10 s vortex, the solution was kept 30 min at room temperature. Then 4.2 μ L of 0.54 mM liposomes diluted in 195.8 μ L HEPES were added on polyplexes, mixed by three gentle pipetting. After 15 min at room temperature, the solution was completed to 500 μ L with serum-free medium (N/P of 3.5). LPD containing 65 nM decoy were prepared as followed. Three μ L of 10 μ M decoy were diluted in 1.8 μ L of HEPES. Then polyplexes were formed by adding 1.8 μ L of 0.5 mg/mL PTG1 in the decoy solution. After 10 s vortex, the solution was kept 30 min at room

temperature. Then 3.6 μL of 0.54 mM liposomes diluted in 196.4 μL HEPES were added on the polyplexes, mixed by three gentle pipetting. After 15 min at room temperature, the solution was completed to 500 μL with serum-free medium. LPRiD containing 65 nM siRNA plus 65 nM decoy were prepared as followed. Three μL of 10 μM decoy and 6.5 μL of 5 μM siRNA were diluted 4.5 μL of HEPES. Then polyplexes were formed by adding 4.5 μL of 0.5 mg/mL PTG1 in the siRNA + decoy solution. After 10 s vortex, the solution was kept 30 min at room temperature. Then 9 μL of 0.54 mM liposomes diluted in 196.4 μL HEPES were added on polyplexes, mixed by three gentle pipetting. After 15 min at room temperature, the solution was completed to 500 μL with serum-free medium.

2.6. Size and zeta potential measurements

Size and zeta potential of lipopolyplexes were measured in HEPES by Quasi-elastic laser light scattering and electrophoretic mobility with the SZ-100 Nanopartica (Horiba, Les Ulis, France), respectively. Measurements were calibrated with 204 nm latex nanosphere size standards and zeta potential standard.

2.7. Gel shift assay

Lipopolyplexes were prepared as described above with 1 μg of nucleic acid at 3.5 N/P charge ratio. Migration was realized at 100V during 45 min in a 2% agarose gel in a Tris-borate-EDTA buffer (95 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, and 10 mM DTT, pH 8.6). Nucleic acids were visualized with ethidium bromide.

2.8. Transfection

In case of forward transfection, the cells were seeded in 24-well culture plates (1×10^5 cells/cm²) two days before transfection. At the time of transfection, cells were 80% confluent. The medium was removed and cells were washed with serum-free medium. Lipopolyplexes solutions at the indicated concentration were completed to 500 μ L with serum-free media and incubated with cells at 37 °C. After 24 h, the medium was removed and cells were cultured for 24 h in 1 mL of complete culture medium (with 10% FBS) without any transfection reagents at 37°C 5%CO₂. In case of reverse transfection, the cells were harvested with trypsin, washed with PBS and suspended at 10⁶ cells/mL in serum-free media. For 1 well, 100 μ L of this cell suspension were added on the lipopolyplexes solution and then completed to a final volume of 500 μ L with serum-free medium before plated into a 24-well plate. After 4 h, the medium was completed with 500 μ L of complete medium and cells were cultured for 44 h at 37°C 5% CO₂.

2.9. Measurement of luciferase activity

After 48h, cells were harvested with trypsin, and washed with PBS. Luciferase expression in 4T1-Luc cells was quantified using the Promega luciferase assay system E1500 (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Luciferase activity was measured using a luminometer (LUMAT LB 9507), normalized to total cell protein using a BCA protein assay kit (Uptima, Interchim SA, Montluçon, France) and expressed as relative light units (RLU) per mg protein. Data are the mean standard deviation of two experiments, each in duplicate.

2.10. Endocytosis

Two days before endocytosis, 4T1 cells were seeded in 24-well culture plates (1×10^5 cells/cm²). Lipopolyplexes were prepared as indicated and incubated for 1h, 2h and 4h with 4T1 cells. Cells were harvested with trypsin, collected into FACS tubes and washed with PBS. The cell-associated fluorescence intensity was measured with a flow cytometer (FACSort; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) with $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30$ nm. The fluorescence intensity was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of 5000 events. Each condition was analyzed three times: the first time, the fluorescence intensity was measured in PBS (total fluorescence), the second time, trypan blue was added into the tube at a final concentration of 0.004 % to quench the fluorescence associated on the surface of cells. The third time, monensin was added at a final concentration of 0.03 mg/mL and incubated during 30 min before fluorescence intensity measurement in order to measure the fluorescence intensity upon neutralization of acid intracellular compartments.

2.11. Semi qPCR

4T1-Luc and 4T1 cells were transfected with the indicated formulations. After 48 h, cells were harvested in 500 μ L of Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (RNeasy, Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed to cDNA using 10 μ L of master mix solution (master mix solution without RNA for a single reaction): 1 μ L random hexamer primer, 4 μ L 5 $\times$ reaction buffer, 1 μ L Ribolock RNase inhibitor (20 U/ μ L), 2 μ L at 10 mM dNTP Mix, 2 μ L M-MuLV reverse transcriptase (20 U/ μ L) (cDNA synthesis kit, Qiagen) and nuclease-free water to 20 μ L. The reaction was incubated at 37 °C for 60 min and then for

5 min at 70 °C. Total cDNA yield were measured at the Nanodrop. For semi-quantitative PCR, PCR products were generated from 100 ng of cDNA template with 2.5 µL of 10µM specific primers (Luc/STAT3/GAPDH), 9 µL nuclease-free water and 12.5 µL PCR mastermix (Promega). PCR conditions were as follows: denaturation 94°C during 5 min, 35 cycles of elongation (30 sec at 94°C, 45 sec at 60°C, 2 min at 72°C) and final extension 72°C during 7 min. Experiment was done two times. Intensity of PCR bands was measured using ImageJ software.

2.12. Viability assay

4T1 cells were reverse-transfected and viability was measured after 48 h using AlamarBlue® (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). 100 µL of AlamarBlue® reagent (1/10th of final volume of the well) were added directly into the cell culture medium and incubated for 2 h at 37°C 5%CO₂. Fluorescence intensity was measured using Victor V3 (Perkin Elmer, Waltham, MA) with $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ and the control was determined using cells that underwent the same manipulations without any treatment. Experiment was done two times in duplicate.

2.13. Protein extraction

Cells were reverse-transfected with the indicated formulations and plated into 6-well plates. At 48 h, cells were lysed for 20 min in ice with 100 µL of RIPA buffer containing 1% cocktail of protease inhibitors (AEBSF, aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, pepstatin A), 1% PMSF (0.1 M), 50 µl Sodium Fluoride (1 M), 1% Sodium Orthovanadate (0.1 M) and 10% Na pyrophosphate (0.2 M). Then, lysates were centrifuged at 4°C for 10 min at 3500 rpm. Protein concentration was determined using BCA protein assay kit.

2.14. Apoptosis measurement

Cells were reverse-transfected with indicated formulations and plated into 24-well plates. After 48h, cells were harvested, washed with PBS and processed with Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) according to the manufacturer's instructions. Cell fluorescence intensity was visualized by flow cytometry with $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ nm}$ for FITC fluorescence and $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$ for propidium iodide. Experiments were done two times in duplicate.

2.15. Western-Blot

Ten μg of total protein were mixed with loading buffer, denatured at 95°C for 5 min, loaded into 10% SDS polyacrylamide gel and migration was realized at 180 V during 1 h. Proteins were transferred on a PVDF membrane using Trans-Blot Turbo Transfer system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Membranes were blocked during 3 h with TBST 5% nonfat dry milk blocking buffer. Subsequently the membranes were probed with anti-STAT3, anti-phospho-STAT3, anti-Bcl- X_L (Cell Signaling Inc., Danvers, Massachusetts, USA), and anti-actin (Sigma). After washing with TBST, membranes were incubated with horseradish peroxidase labeled anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen), for 45 min and protein were visualized by chemiluminescence with Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad). Protein bands were quantified using ImageJ software. Experiment was done two times.

3. Results

3.1. Lipopolyplex characterization

Lipopolyplexes comprising either siRNA (LP_{ri}), DNA molecular decoy (LPD) or both (LP_{ri}D) were prepared at a (N/P) charge ratio of 3.5. Lipopolyplexes were formed with Lip100 liposomes made with KLN25 exhibiting a permanent positive charge and MM27 acquiring a cationic charge thanks to the imidazole group when the pH of the medium drops below pH 6. The polymer was linear polyethyleneimine of 22 kDa substituted with 16% of histidine residues (His-IPEI). Both Lip100 and His-IPEI contained protonable groups (secondary amino and imidazole groups) that induce an acid-mediated membrane destabilization of endosomes by an increased fusogenicity of liposomes and a proton sponge effect *via* His-IPEI favoring nucleic acids delivery in the cytosol. In order to be specific to 4T1 cells, lipopolyplexes were decorated with folate (FA) using Lip100 containing DSPE-PEG2000-FA targeting the folate receptor overexpressed on these cells. PEG-Lip100 liposomes (KLN25:MM27: DSPE-PEG2000; 47.5/47.5/5 mol : mol : mol) and Folate liposomes (FA-Lip100) (KLN25:MM27: DSPE-PEG2000: DSPE-PEG2000-FA; 47.5/47.5/3/2 mol : mol : mol : mol) were prepared in such a way that the totality of DSPE-PEG2000 was 5%. As shown by gel shift retardation assay, the majority of siRNA, decoy or both were complexed at charge ratio of 3.5 with His-IPEI and these liposomes to make lipopolyplexes (**Fig. 1**). A small amount of each type of nucleic acids remained free (20% for siRNA, siRNA + decoy and 10% for decoy).

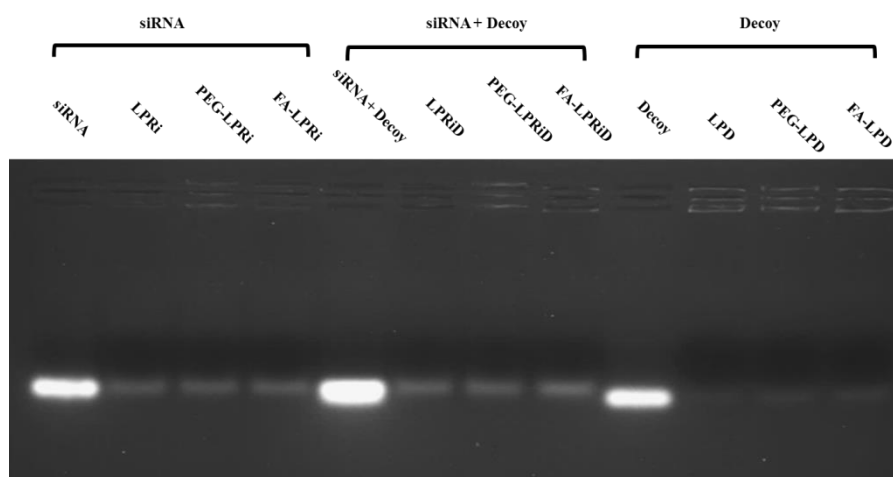


Figure 1: Agarose gel shift assay of lipopolyplexes. Lipopolyplexes were formulated at N/P ratio of 3.5 with 1 μ g of siRNA or 1 μ g of decoy or both. Samples (20 μ L) were analyzed by 2% agarose gel and siRNA/decoy visualized with ethidium bromide.

Then the size and zeta potential of liposomes and lipopolyplexes were measured (**Table 1**). The size of PEG-Lip100 and FA-Lip100 was slightly bigger (92 nm and 83 nm, respectively) than Lip100 due to the presence of PEGylated lipids in their bilayer. No significant size difference was observed after addition of Lip100 to His-IPEI made either with siRNA, decoy or both. In contrast, the sizes of PEG-LPRi, FA-LPRi, PEG-LPD, FA-LPD, PEG-LPRiD and FA-LPRiD were slightly bigger than their respective liposomes. They were close to 100 nm and 107 nm except for FA-LPD (117 nm). They all showed a polydispersity index below 0.36 which means that the population was rather monodisperse with no aggregated particles. All lipopolyplexes displayed a positive zeta potential varying from 35.7 mV to 62.4 mV. They were less positive than their respective liposomes. For LPRi (including those made with PEG-Lip100 and FA-Lip100), LPRiD and LPD made with Lip100 the charge reduction was 22% to 30% whereas it was more reduced with LPD and LPRiD made with PEG-Lip100 and FA-Lip100 (37% to 45%).

Table 1: Size, polydispersity index and ζ potential of liposomes and lipopolyplexes.

Liposomes			
	Lip100	PEG-Lip100	FA-Lip100
Size (nm)	72 $\pm$ 1	92 $\pm$ 14	83 $\pm$ 3
PI	0.35	0.35	0.36
ζ (mV)	74 $\pm$ 1	65 $\pm$ 6	70 $\pm$ 5
siRNA			
	LPRi	PEG-LPRi	FA-LPRi
Size (nm)	69 $\pm$ 4	102 $\pm$ 8	107 $\pm$ 9
PI	0.22	0.23	0.28
ζ (mV)	55 $\pm$ 4	46 $\pm$ 2	53 $\pm$ 1
DNA Decoy			
	LPD	PEG-LPD	FA-LPD
Size (nm)	83 $\pm$ 13	106 $\pm$ 0.5	117 $\pm$ 3
PI	0.22	0.27	0.31
ζ (mV)	62 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	42 $\pm$ 2
siRNA + DNA decoy			
	LPRiD	PEG-LPRiD	FA-LPRiD
Size (nm)	74 $\pm$ 3	101 $\pm$ 3.5	103 $\pm$ 4
PI	0.26	0.35	0.34
ζ (mV)	58 $\pm$ 2	39 $\pm$ 4	44 $\pm$ 2

3.2. Inhibition efficiency of LPRi in 4T1-Luc cells

Figure 2 shows inhibition of the luciferase activity in 4T1-Luc cells at 48h post-transfection with LPRi containing anti-Luc siRNA. The inhibition was dose-dependent, saturated soon with 25 nM siRNA and reached a maximum of 84% at 50 nM of siRNA. The inhibition values expressed as the percentage of that obtained when the cells were transfected with LPRi containing the scramble siRNA showed the specificity of the inhibition.

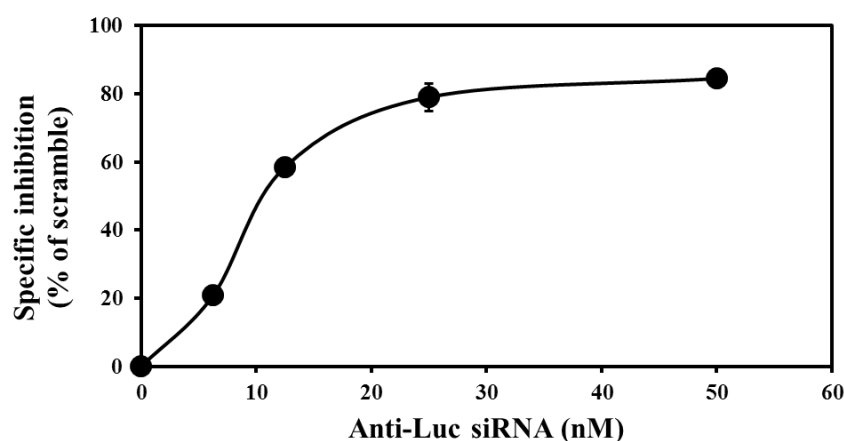


Figure 2: Luciferase inhibition with anti-Luc LPRi. 4T1-Luc cells were transfected for 24h with various dilution of LPRi containing anti-Luc siRNA or scramble siRNA and then medium was replaced by complete culture medium for 24 h. The luciferase activity (RLU) in cell lysates was measured, normalized by BCA assay and expressed as the ratio of RLU/mg of protein in cells treated with anti-Luc siRNA to that in cells treated with scramble siRNA (% of scramble).

The effect of LPRi containing anti-Luc siRNA was also measured at the mRNA level (**Fig. 3**). The semi quantitative PCR experiment at 48h post-transfection confirmed that the quantity of LucGL4 mRNA was lower than that in non-treated cells and was dose-dependent. At 50 nM and 25 nM anti-Luc siRNA, the level of LucGL4 mRNA was 39% and 40% of the quantity in non-treated cells, respectively. In contrast, the quantity of luciferase mRNA upon transfection with LPRi containing the scramble siRNA remained similar to that in non-treated cells which also demonstrated the specificity of the inhibition. In order to target 4T1 cells, Lip100 comprising 0%, 0.5 %, 1 % and 2 % of DSPE-PEG2000-FA were prepared. All these liposomes were adjusted to 5% DSPE-PEG2000 by adding 5%, 4.5%, 4% and 3% of DSPE-PEG2000, respectively.

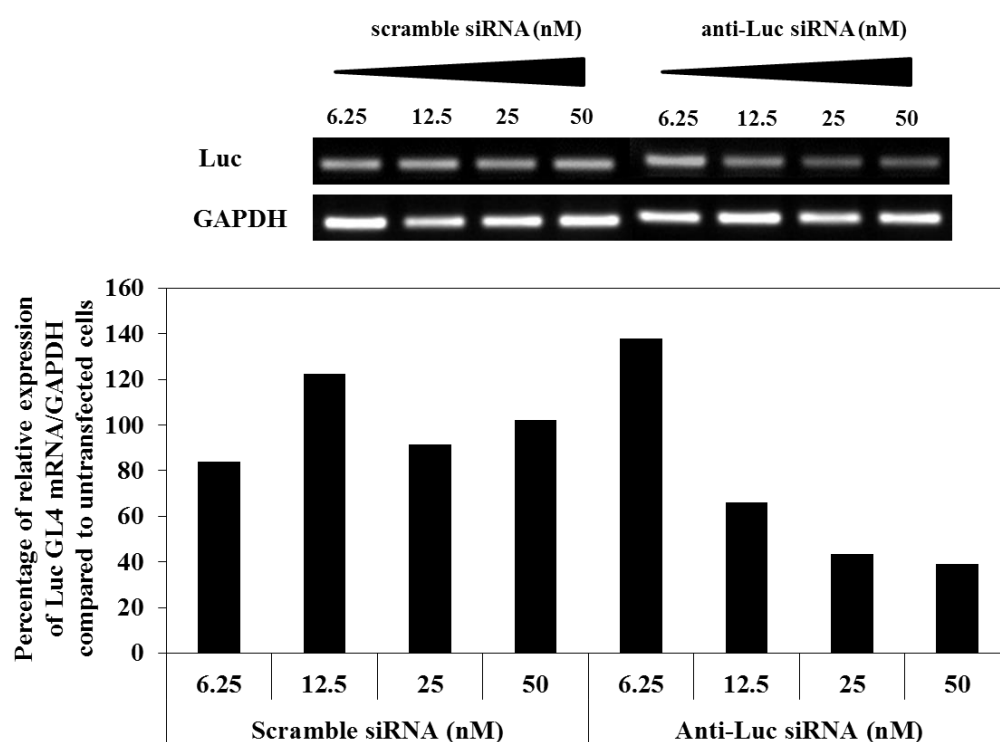


Figure 3: Relative quantification of luciferase mRNA in 4T1-Luc cells transfected with anti-Luc siRNA LPRI. (A) After 48 h post-transfection, the total RNA of 4T1-Luc cells was extracted and reverse-transcribed to cDNA. PCR products were generated from 100 ng of cDNA template by using specific primers for Luc and GAPDH. Experiment was done two times. (B) Relative quantification of semi-quantitative PCR bands normalized with GAPDH and compared to non-transfected 4T1-Luc cells. Intensity of PCR bands was measured using ImageJ software.

Then, FA-LPRI were formed with His-IPEI polyplexes containing siRNA (anti-Luc or scramble) and the 4T1-Luc cells were transfected. After 48h post-transfection, the specific inhibition of the luciferase expression depended on the amount of folate (**Fig. 4**). In the absence of folate, the inhibition was only 26%, it reached 54% with 2% folate. Increasing the amount of folate up to 5% did not provide more inhibition indicating that 2% was enough (data not shown).

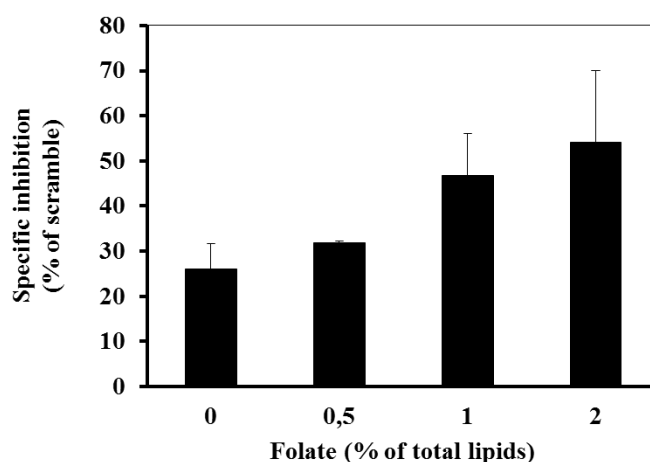


Figure 4: Luciferase inhibition with FA-LPRi. 4T1-Luc cells were transfected for 24 h with FA-LPRi prepared with different amounts of folate targeted lipid (DSPE-PEG-FA) containing either 50 nM anti-Luc siRNA or 50 nM scramble siRNA and then medium was replaced by complete culture medium for 24 h. The luciferase activity (RLU) in cell lysates was measured, normalized by BCA assay and expressed as the ratio of RLU/mg of protein in cells treated with anti-Luc siRNA to that in cells treated with scramble siRNA (% of scramble).

Here, the inhibition level obtained with PEG-LPRi without folate was lower than that obtained with LPRi without PEG (**Fig. 3**). The presence of 5% DSPE-PEG2000 in PEG-LPRi reduced the ζ potential compared to LPRi (46 ± 2.5 mV *versus* 55 ± 4 mV) and thus the interaction with the cell membrane and uptake by the cells. For the same reason, the maximal inhibition of 54% obtained with FA-LPRi was lower than with LPRi without PEG (**Fig. 3**). However FA-LPRi was expected to deliver siRNA more specifically *in vivo* by preventing nonspecific binding to untargeted cells and increasing their blood circulation time.

3.3. Uptake of LPRi by 4T1 cells

Uptake of LPRi was tested in 4T1 cells over a 4h period by flow cytometry. LPRi were prepared with siRNA conjugated with fluorescein. The cell associated fluorescence was analyzed three times: first, the mean of the fluorescence intensity (MFI) of the cells was measured without any further treatment; second, MFI was measured after incubation with trypan blue to quench the fluorescence associated on the cell surface to measure only the fluorescence present inside the cells. The difference between the former and the latter measurements gave the fluorescence associated to the cell surface. Lastly, after trypan blue treatment, the cells were incubated in the presence of monensin to increase the signal of fluorescein-labeled siRNA potentially quenched in acid compartments like endosomes and lysosomes. Monensin is an ionophore which equilibrates pH between cytosol and acid compartments. The results showed that the binding of LPRi on the surface of 4T1 cells was higher than that of PEG-LPRi and FA-LPRi due to the higher ζ potential of LPRi (**Fig. 5A**). The amount of internalized LPRi was maximal after 1h incubation and then decreased over the 4h period. In contrast, the internalization of PEG-LPRi and FA-LPRi increased with the incubation time and was higher than that of LPRi after 4h; as expected, the amount of FA-LPRi being higher than that of PEG-LPRi (**Fig. 5B**). When the cells were post-treated with monensin, the increased MFI was indicative of the presence of siRNA in acidic compartments and thus an uptake mediated by the clathrin pathway (**Fig. 5C**). After monensin treatment, it appeared that FA-LPRi was more accumulated in the cells than PEG-LPRi likely due to the recognition of the FA moiety by the folate receptor. Monensin enhancement was higher for FA-LPRi (≥ 2) than for PEG-LPRi (1.5 to 2) suggesting that siRNA was in more acidic compartments with FA-LPRi than with PEG-LPRi (**Fig. 5D**). In contrast, there was no increase for LPRi indicating that siRNA was not in an acidic compartment.

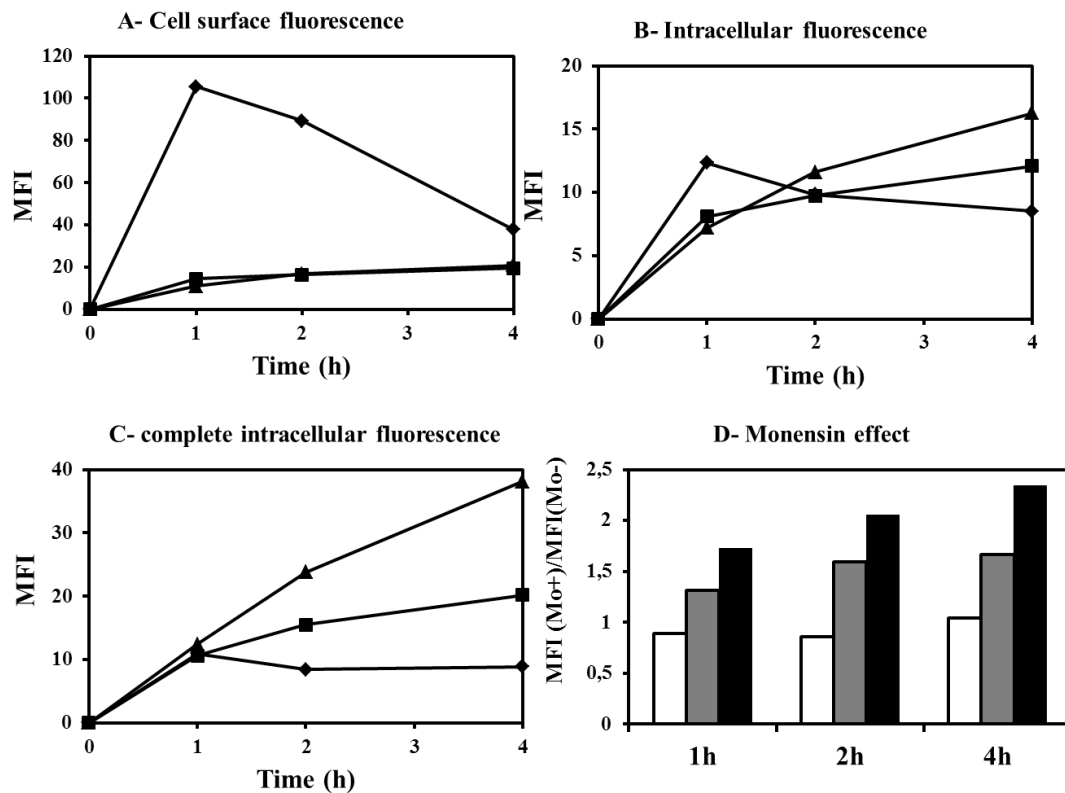


Figure 5: LPRi endocytosis by 4T1 cells. The cells were incubated at 37°C over a 4 h period with either (♦) (white bar) LPRi, (▲) (black bar) FA-LPRi or (■) (grey bar) PEG-LPRi containing 100 nM fluorescein-labeled siRNA. The cell fluorescence intensity was measured at the indicated times by flow cytometry before and after trypan blue and monensin treatment. MFI is the mean of the fluorescence intensity. **(D)** Monensin effect was the ratio between MFI of cells treated with trypan blue and monensin (MFI (Mo+)) to MFI of cells treated with trypan blue (MFI(Mo-)). (white bar) LPRi, (black bar) FA-LPRi, (grey bar) PEG-LPRi contained 100 nM fluorescein-labelled siRNA.

3.4. Delivery of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 decoy

4T1 cells were transfected with LPRi, LPD and LPRiD containing anti-STAT3 siRNA, anti-STAT3 decoy and both, respectively. After 48h post-transfection, the effect of siRNA and decoy was analyzed by semi-quantitative PCR (**Fig. 6A**). As for the inhibition of

luciferase mRNA with anti-Luc siRNA, the quantity of STAT3 mRNA was dramatically and specifically reduced upon transfection with 65 nM anti-STAT3 (15% of STAT3 mRNA detected) whereas no inhibition was observed with the scramble siRNA (**Fig. 6B**). The quantity of STAT3 mRNA did not decrease upon transfection with 65 nM anti-STAT3 DNA decoy as expected for the decoy which interacts with the protein. When the 4T1 cells were transfected with LPRiD containing 65 nM anti-STAT3 siRNA plus 65 nM anti-STAT3 DNA decoy, there was also reduction of the amount of STAT3 mRNA by anti-STAT3 siRNA (43% of STAT3 mRNA detected).

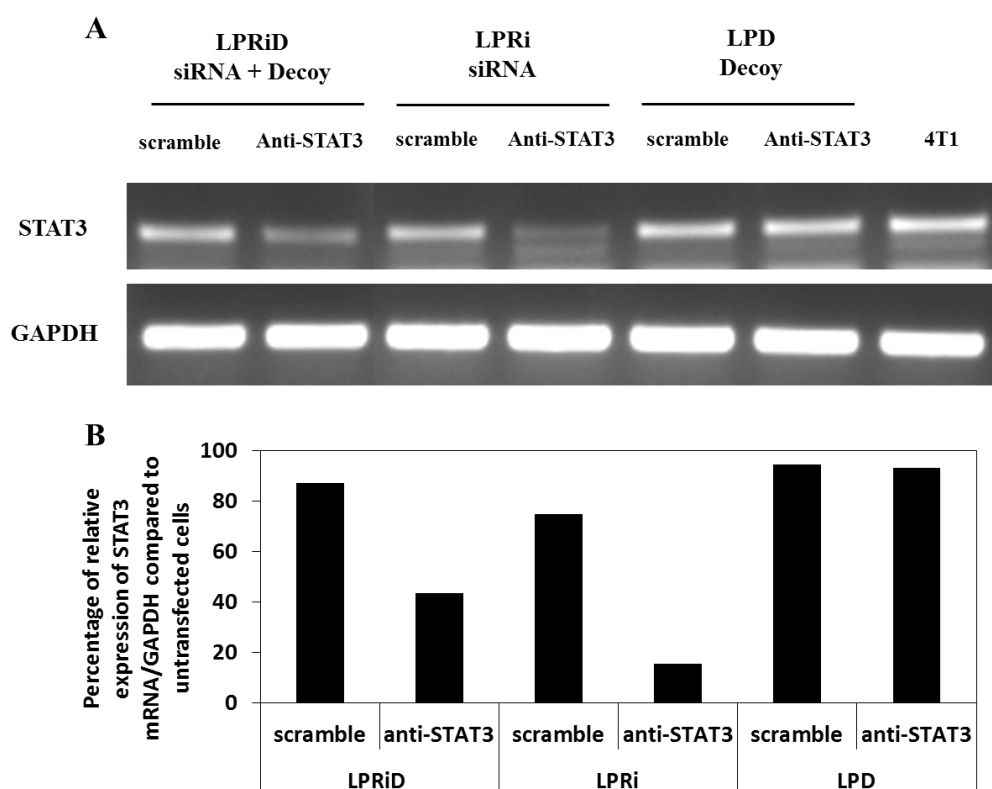
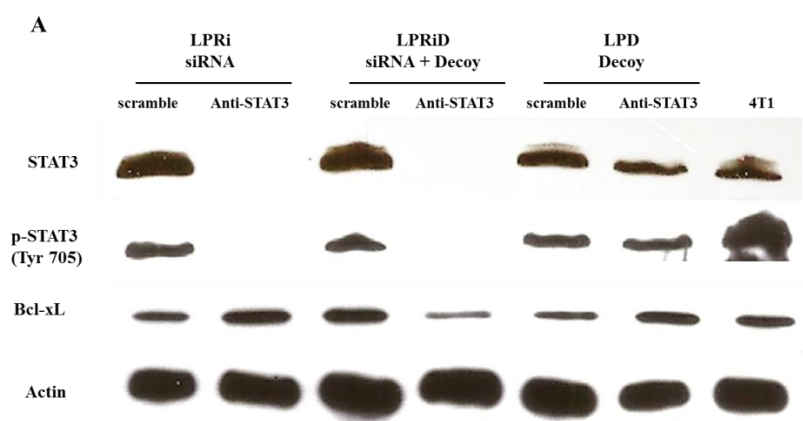


Figure 6: Effect of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy transfection on the STAT3 mRNA level in 4T1-Luc cells. (A) After 48 h post-transfection with either LPRi containing anti-STAT3 siRNA, LPD containing anti-STAT3 DNA decoy or LPRiD containing both anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy, the total RNA of 4T1 cells was extracted and reverse-transcribed to cDNA. PCR products were generated from 100 ng of cDNA template by using specific primers for STAT3 and GAPDH. Experiment was done two

times. Same experiments were performed with scramble siRNA and scramble DNA decoy. The siRNA and DNA decoy concentration was 65 nM. **(B)** Relative quantification of semi-quantitative PCR bands normalized with GAPDH and compared to non-transfected 4T1 cells. Intensity of PCR bands was measured using ImageJ software.

Western blots were performed to confirm whether the STAT3 mRNA inhibition induced also reduction of STAT3 protein. They showed the absence of STAT3 in both LPRi and LPRiD transfected 4T1 cells and a decrease of amount of STAT3 protein in LPD transfected cells (**Fig. 7A**). LPRi and LPRiD also completely inhibited phosphorylated STAT3 compared to the scramble counterparts. No change was observed with anti-STAT3 DNA decoy on the expression of phosphorylated STAT3. STAT3 is the transcription factor of Bcl-xL, a gene involved in apoptosis inhibition. When checked, a Bcl-xL inhibition was only detected in 4T1 cells transfected with LPRiD containing anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy. Quantitatively, the remaining Bcl-xL amount corresponded to 32% of the Bcl-xL amount in cells treated with the corresponding LPRiD containing siRNA and decoy scramble (**Fig. 7B**).



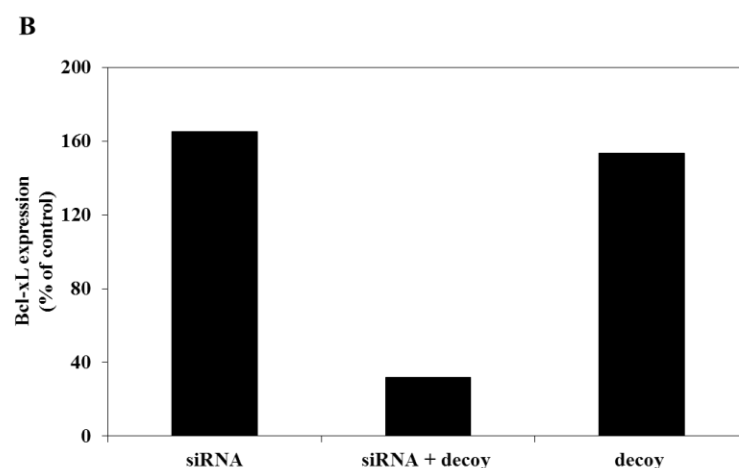


Figure 7: Effect of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy transfection on STAT3 and Bcl-XL amount in 4T1 cells. (A) After 48 h post-transfection with either LPRi containing anti-STAT3 siRNA, LPD containing anti-STAT3 DNA decoy or LPRiD containing both anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy, proteins were extracted and Western-Blot was performed. Subsequently the membranes were probed with anti-STAT3, anti-phospho-STAT3, anti-Bcl-xL and anti-actin antibodies. Proteins were then revealed with horseradish peroxidase labeled anti-rabbit secondary antibody and visualized by chemiluminescence with Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad). Protein bands were quantified using ImageJ software. Same experiments were performed with scramble siRNA and scramble decoy. Experiment was done two times. **(B)** Quantification of Bcl-xL western-blot bands using ImageJ. Intensity was normalized with actin and expressed as the percentage of expression relative to the scramble experiment. The siRNA and DNA decoy concentration was 65 nM.

3.5. Effect on cell proliferation of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 decoy.

The effect of LPRi containing the anti-STAT3 siRNA or LPD containing the anti-STAT3 DNA decoy was assessed on the 4T1 cell proliferation (**Fig. 8**). After 48 h transfection with anti-STAT3-siRNA and anti-STAT3 DNA decoy, the number of cells was

reduced by 10% and 80%, respectively showing that DNA decoy was more efficient than siRNA at the same nucleic acid concentration. Such decoy activity indicated that STAT3-dependent pathway was indeed implicated in 4T1 cell growth.

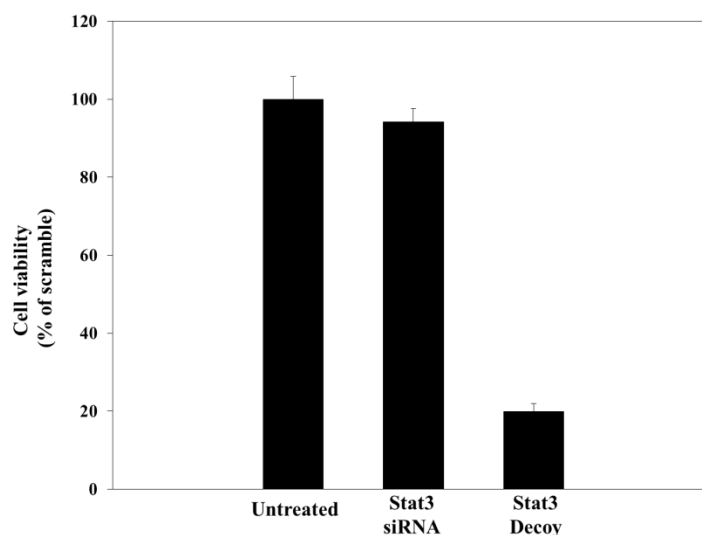


Figure 8: Effect on the cell proliferation of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy transfection. 4T1 cells were transfected either with anti-STAT3 siRNA LPRi or anti-STAT3 DNA decoy LPD at a final concentration of 50 nM. Same experiments were performed with scramble siRNA and scramble DNA decoy. 48 h post-transfection, the number of 4T1 cells was measured using the AlamarBlue® assay. The cell viability was expressed as the percentage of living cells related to cells treated with the corresponding scramble siRNA or scramble DNA decoy.

Next, we compared the anti-proliferative effect of the DNA decoy as a function of time and also of the presence of folate on lipopolyplexes. As shown in **Figure 9A**, LPD exhibits a strongly reduced cell proliferation from 24 h to 72 h with a maximal effect at 48 h. Comparatively, the low effect of LPRi containing anti-STAT3-siRNA was maximum at 48 h and became negligible at 72 hours (data not shown). When liposomes were replaced by

folate liposomes, the anti-proliferative activity of anti-STAT3 DNA decoy became significantly weaker (30%) at 24 h as compared to LPD without folate and negligible at both 48 h and 72 h (Fig. 9B).

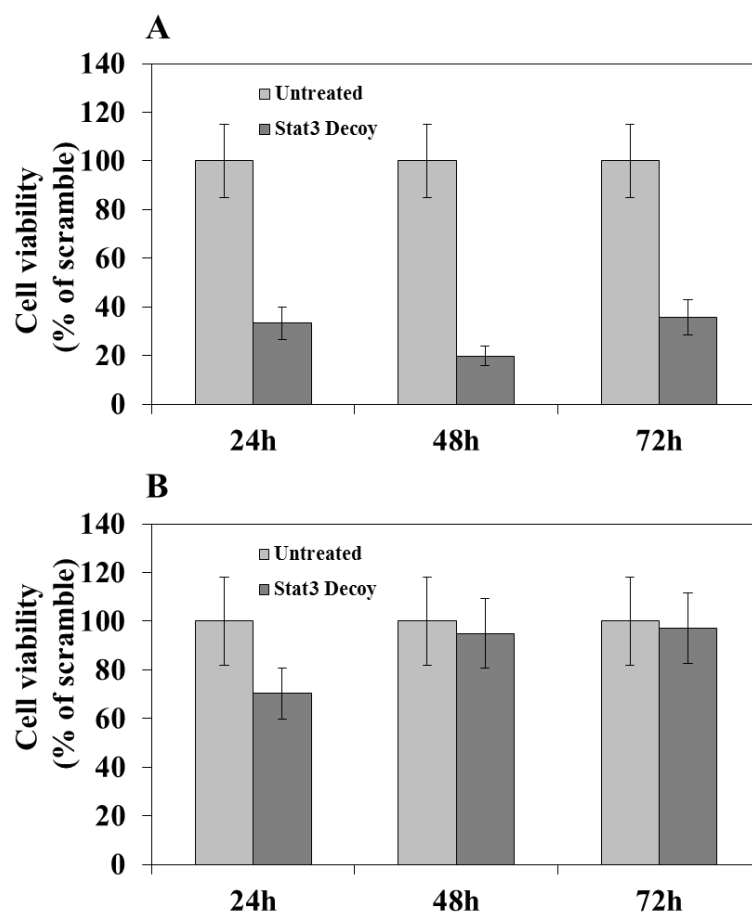


Figure 9: Comparative effect on the cell proliferation between FA-LPD and LPD containing anti-STAT3 DNA decoy. 4T1 cells were transfected either with anti-STAT3 DNA decoy delivered with LPD (A) or FA-LPD (B) at a final concentration of 50 nM. Same experiments were performed with scramble DNA decoy. 48 h post-transfection, the number of 4T1 cells was measured using the AlamarBlue® assay. The cell viability was expressed as the percentage of living cells related to cells treated with scramble DNA decoy.

3.6. Effect on the cell proliferation of the co-delivery of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy.

We next wanted to know whether the co-encapsulation of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy in lipopolyplexes would increase inhibition of the 4T1 cell growth. For this purpose, cell death and apoptosis was determined at 48 h post-transfection by flow cytometry upon FITC-annexin V/PI staining of 4T1 cells. **Figure 10** shows flow cytometry dot plots of FITC-annexin-V/PI staining of 4T1 cells treated either with 50 nM DNA decoy alone, 50 nM siRNA alone or in combination at 50 nM each. This experiment indicates that anti-STAT3 siRNA induced significantly less cytotoxicity than anti-STAT3 DNA decoy which is qualitatively consistent with the cell proliferation experiment described above. Anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy induced 5% and 16% of apoptotic cells, respectively. In contrast, the apoptotic cells amount reached 35% when they were co-delivered. This value was 1.7 times more elevated than a simple additive effect (21%) and suggested that a synergic effect would occur when anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy were co-delivered.

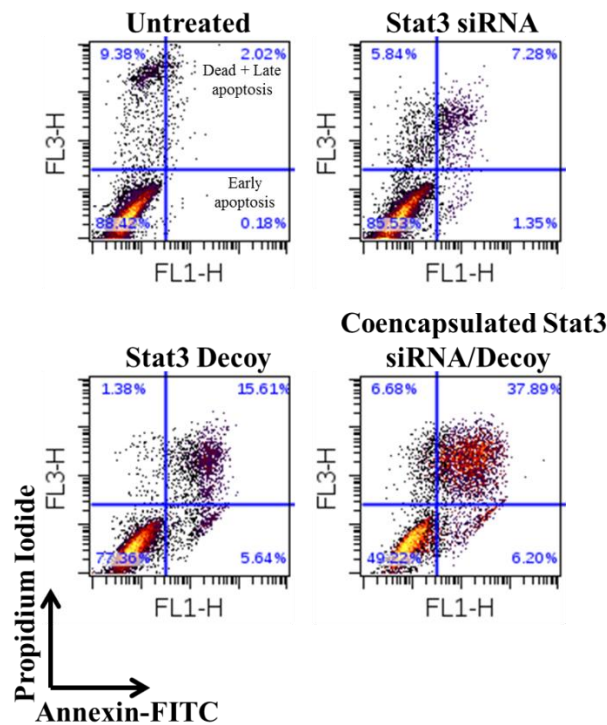


Figure 10: Effect on cell proliferation of LPRiD co-encapsulating anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy. Annexin-V/PI flow cytometry dot plots with percentage of apoptotic cells. 4T1 cells were transfected with lipopolyplexes (LPRiD) containing either anti-STAT3 siRNA, anti-STAT3 DNA decoy or both at a final concentration of 50 nM. Same experiments were performed with scramble. 48 h post-transfection, cells were harvested, labelled with FITC-Annexin V and PI and analyzed by flow cytometry.

4. Discussion

Here, we tested the capacity of a lipopolyplex formulation for the transfection of 4T1 cells with siRNA and a DNA decoy. First nucleic acids were complexed with His-lPEI, a cationic polymer having capacity to mediate endosome escape thanks to their acid-protonable imidazole and secondary amino groups. Then, polyplexes were encapsulated in cationic liposomes comprising also imidazole residues favoring acid-mediated fusion with

endosome membrane. Moreover, liposomes were decorated with folate residues in order to confer cell specificity *via* the overexpressed folate receptors on tumor cells. By using the mammary tumor cells line (4T1-Luc) stably expressing luciferase, we demonstrated the good inhibitory efficiency of LPRi containing anti-luc siRNA in dose-dependent manner both at the protein and mRNA levels. The inhibition of the luciferase activity and its mRNA level were close to 80% at 50 nM siRNA. We also demonstrated that FA-LPRi exhibited better uptake thanks to the FA moieties, in a FA quantity dependent manner. FA was linked to a DSPE-PEG lipid in order to move it away from the liposome surface and to facilitate FA recognition by the folate receptors. All targeted formulations were prepared including 5% of PEGylated lipid to create stealth liposomes. At this concentration, PEG groups adopt a mushroom conformation (Barenholz, 2001). Addition of PEG lipids improves formulation stability and avoids aggregation (Rovira-Bru et al., 2002). In case of *in vivo* delivery, PEG incorporation reduces the recognition of lipid-based nanoparticles by mononuclear phagocytes, increases their life time in the blood circulation, their capacity to cross the tumor vascular endothelium by EPR effect and their accumulation in tumor cells (Immordino et al., 2006; Maeda, 2010). The optimal quantity of DSPE-PEG2000-FA incorporated in the liposome was 2% (based on total lipid content). No increase in the luciferase inhibition by anti-Luc siRNA was obtained following incorporation of 5% and more folate lipid. The better efficacy of FA-LPRi uptake by 4T1 cells was demonstrated based on their higher uptake than the PEG-LPRi counterpart. The luciferase inhibition by anti-Luc siRNA at the protein and mRNA levels was also higher than with PEG-LPRi. Although the FA-LPRi uptake was higher than the non-PEGylated LPRi one, the luciferase inhibition at the protein and mRNA levels were lower than with non-PEGylated LPRi. In contrast to FA-LPRi and PEG-LPRi, post-treatment with monensin did not increase MFI of cells incubated with non-PEGylated LPRi suggesting that with the latter, siRNA was

internalized *via* non-acidic vesicles in line with the endocytosis pathway of same lipopolyplexes made with a plasmid DNA which were found to be taken up *via* caveolae by murine skeletal muscle (C2C12) cells (Billiet et al., 2012). It was also in line with data reporting that these lipopolyplexes colocalized with early endosomes (Rab5 positive vesicles) and not with late endosomes (Rab7 positive vesicles) in a dendritic cells line (DC2.4) in contrast to the mannosylated lipopolyplexes recognized by the mannose receptor on these cells (Perche et al., 2011). Indeed, it should be stressed that it has been reported that cargo molecules taken up by caveolea can join early endosomes (Hayer et al., 2010; Pelkmans et al., 2004). The different internalization process between PEGylated and non-PEGylated LPRi could be due to the higher ζ potential of the non-PEGylated LPRi that bound mainly *via* electrostatic interactions with the anionic charges on the cell surface. This binding could occur in cholesterol-rich domains due to the hydrophobicity of LPRi surface. PEGylated lipopolyplexes, less cationic and less hydrophobic, stuck less to the cell surface. Compared to PEG-LPRi, FA-LPRi were taken up by receptor-mediated clathrin dependent endocytosis which provided rapid delivery in late endosomes and lysosomes in line with the high monensin enhancement revealing a high acidic environment, limiting their endosome escape. This could also explain the higher efficiency of anti-Luc siRNA delivered by LPRi *versus* FA-LPRi to inhibit luciferase activity and its mRNA level in 4T1 cells culture. It has been reported that PEG-lipid in liposomes can impair their fusion capacity in endosomes (Chan et al., 2012). This can be reversed by using reducible PEG-lipid such as DSPE-SS-PEG2000. Meanwhile the biodistribution and accumulation of FA-LPRi in tumor cells are expected more selective than the highly cationic LPRi upon injection in the blood circulation.

The delivery efficiency of siRNA with LPRi was also demonstrated by using anti-STAT3 siRNA. At 65 nM, 85% and 100% of STAT3 mRNA and STAT3 were inhibited, respectively.

SiRNA and DNA molecular decoy possess a structure that is close, thus a similar formulation (LPD) was used to transfect anti-STAT3 DNA decoy made of a double stranded oligodeoxyribonucleotide having the capacity to bind to STAT3 in order to prevent its transcription activity towards apoptosis inhibition. We demonstrated that as expected anti-STAT3 DNA decoy did not inhibit the level of STAT3 mRNA. Anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy showed specific inhibition since the inhibition level with the scramble siRNA and the scramble molecular decoy was low.

These results let us to envisage cell proliferation inhibition thanks to STAT3 inhibition with siRNA and/or DNA decoy. The reduction of the cell proliferation with anti-STAT3 siRNA was weak (10%) whereas anti-STAT3 DNA decoy (80%) showed an eight fold increased anti-proliferative effect at the same concentration. The anti-STAT3 DNA decoy effect was maintained over 72 h post-transfection. However, the anti-proliferative activity of anti-STAT3 DNA decoy was lower (30%) when lipopolyplexes were decorated with FA-PEG. This was in line with the lower activity of anti-STAT3 siRNA when lipopolyplexes were decorated with FA-PEG which was likely related to a lower endosome escape of nucleic acids than with non-PEGylated LPDi. Here, we found that anti-STAT3 siRNA delivered with lipopolyplexes in 4T1 cells has no substantial effect on 4T1 cell growth inhibition although such siRNA decreases significantly STAT3 mRNA and protein level. Previous results have shown that constitutively anti-STAT3 siRNA production in 4T1 cells have no effect on cell proliferation *in vitro* (Ling and Arlinghaus, 2005). Such finding was also observed in melanoma cells and a concomitant activation of NF- κ B upon either constitutive shRNA production or siRNA delivery by electroporation was correlated to silencing inefficiency (Ramji et al., 2013). Although NF κ B activation could participate in the observed silencing inefficiency, it is important to note that total STAT3 and its active phosphorylated form (pSTAT3) was partially decreased following RNA silencing; notably, pSTAT3 active form

was still present suggesting that the lack of effect of RNA silencing on cell survival could be in part related to uncomplete STAT3 inhibition. Anti-STAT3 siRNA inefficiency in 4T1 was observed when nucleic acids delivery was carried out by a cationic liposome such as Lipofectamine 2000 (Tian et al., 2012). Also, Lipofectamine 2000 mediated delivery of anti-STAT3 siRNA in head and neck cancer cells was used no effect on the cell proliferation was observed despite a strong knockdown of STAT3 suggesting that siRNA is indeed not efficient in such cancer cell line (Wheeler et al., 2010). Altogether these previous data are in line with our present data indicating that anti-STAT3 siRNA was weakly effective in inducing inhibition of 4T1 cell proliferation *in vitro*. In the course of studies devoted to the design of *in vivo* anticancer strategies using anti-STAT3 siRNA, several investigators have noted that siRNA targeting STAT3 has nominal effect on *in vitro* cancer cell growth contrasting to the striking *in vivo* effects in different tumor models in mice. The lack of activity on *in vitro* cell growth is not yet known although several hypotheses have been proposed. Especially, the finding that anti-STAT3 siRNA is indeed capable to induce significant decrease of total STAT3 and pSTAT3 protein level has led authors to the proposal that in cancer cells apparently resistant *in vitro* to anti-STAT3 siRNA treatment, other STAT3 independent survival pathways were activated.

We unexpectedly reported that anti-STAT3 DNA decoy have a strong inhibition effect on 4T1 cell growth *in vitro*. Such data contradict the current hypothesis proposed to explain the inefficacy of anti-STAT3 siRNA, i.e. STAT3 dependent pathway plays no role for *in vitro* cancer cell survival. Thus, we propose that the pSTAT3 activity is still sufficient to enable persistent cellular proliferative activity even in the presence of anti-STAT3 siRNA. To verify our hypothesis, we co-encapsulated anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy in lipopolyplexes to determine whether siRNA could participate in inducing an additive effect onto the anti-proliferative anti-STAT3 DNA decoy activity. Our data show

that co-encapsulation enables an enhanced cancer cell death in a supra-additive manner. Such experiment suggests that anti-STAT3 siRNA plays a role in the anti-proliferative effect of 4T1 cells. Experiments are in progress to determine whether such supra-additive effect could be correlated at the molecular level with correspondingly decreased expression of pStat3-dependent anti-apoptotic targets such as Bcl-xl and cyclinD1. We found that Bcl-xL was not significantly affected upon transfection with either siRNA or DNA decoy. This seems to contrast with data showing that STAT3 DNA decoy had induced *in vitro* both the decrease of the Bcl-xL oncogene and the proliferation of HNSCC cells (head and neck squamous cell carcinoma) (Leong et al., 2003). Nevertheless, despite the absence of Bcl-xL inhibition, anti-STAT3 DNA decoy was found here to reduce proliferation of 4T1 cells. In contrast, LPRiD containing both anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 decoy inhibited by 32% the amount of Bcl-xL in 4T1 cells. Moreover, the combination of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy lead to an increased reduction of the cell proliferation compared to that obtained with the anti-STAT3 DNA decoy alone. This result suggested a synergic effect between the siRNA and DNA decoy effect. This is the first time that co-delivery of siRNA and molecular decoy is used to treat breast cancer. Co-delivery of siRNA or DNA decoy in combination with chemotherapeutic drugs is more frequent. Chen *et. al* formulated in lipopolyplexes siRNA against c-myc and doxorubicin to treat an ovarian cancer model (Chen et al., 2010). *In vivo*, they decreased multiple drug resistance and tumor growth. Another study reported the delivery of siRNA against Bcl-2 in combination with docetaxel in a model of breast cancer (Zheng et al., 2013). The same strategy has been applied with DNA decoy. One study showed anti-STAT3 DNA decoy delivery in combination with cisplatin, an agent inducing DNA crosslinking and therefore apoptosis (Xi et al., 2005). *In vivo* study showed a decrease in the tumoral volume of HNSCC xenografted mice with anti-STAT3 DNA decoy plus cisplatin in comparison with the molecules delivered separately.

More recently, an *in vitro* study showed that the delivery of anti-STAT3 DNA decoy in combination with doxorubicin, resulted in decreased cell viability (Wang et al., 2015). However, chemotherapeutics and small nucleic acids possess very different physicochemical parameters so it is difficult to encapsulate these two molecules in the same nanocarrier. Chemotherapeutic drugs are often hydrophobic whereas siRNA are hydrophilic (Kang et al., 2015). SiRNA and DNA decoy possess similar structures that allow their co-formulation in the same lipopolyplexes.

5. Conclusion

Lipopolyplexes made with Lip100 liposomes and His-IPEI polymer is an efficient formulation for the functional delivery of siRNA, DNA decoy or both in 4T1 cells. Despite no clear mechanistic explanation yet, the unexpected anti-proliferative effect observed upon the co-delivery of anti-STAT3 siRNA and anti-STAT3 DNA decoy opens pre-clinical applications. For this purpose, folate targeted PEGylated lipopolyplexes will be helpful.

Acknowledgements

This work was supported by grants from “Ligue contre le cancer Grand Ouest”. M-P. Gosselin received PhD fellowship from “Ligue Nationale contre le cancer”. We thank the “Cytometry and Cell Imaging platform” at CBM Orléans. We certify that there is no conflict of interest, no competing of interest and no disclosure.

References

Akira S. (2000). Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19, 2607–2611.

Barbieri, I., Pensa, S., Pannellini, T., Quaglino, E., Maritano, D., Demaria, M., Voster, A., Turkson, J., Cavallo, F., Watson, C.J., et al. (2010). Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors *via* upregulation of Cten. *Cancer Res.* *70*, 2558–2567.

Barenholz, Y. (2001). Liposome application: problems and prospects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* *6*, 66–77.

Bielinska, A., Shivdasani, R.A., Zhang, L.Q., and Nabel, G.J. (1990). Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* *250*, 997–1000.

Billiet, L., Gomez, J.-P., Berchel, M., Jaffrès, P.-A., Le Gall, T., Montier, T., Bertrand, E., Cheradame, H., Guégan, P., Mével, M., et al. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* *33*, 2980–2990.

Burnett, J.C., and Rossi, J.J. (2012). RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* *19*, 60–71.

Chan, C.-L., Majzoub, R.N., Shirazi, R.S., Ewert, K.K., Chen, Y.-J., Liang, K.S., and Safinya, C.R. (2012). Endosomal Escape and Transfection Efficiency of PEGylated Cationic Lipid–DNA Complexes Prepared with an Acid-Labile PEG-Lipid. *Biomaterials* *33*, 4928–4935.

Chen, Y., Bathula, S.R., Li, J., and Huang, L. (2010). Multifunctional nanoparticles delivering small interfering RNA and doxorubicin overcome drug resistance in cancer. *J. Biol. Chem.* *285*, 22639–22650.

Dai, L., Cheng, L., Zhang, X., Jiang, Q., Zhang, S., Wang, S., Li, Y., Chen, X., Du, T., Yang, Y., et al. (2011). Plasmid-based STAT3-siRNA efficiently inhibits breast tumor growth and metastasis in mice. *Neoplasia* *58*, 538–547.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806–811.

Foubert, E., De Craene, B., and Berx, G. (2010). Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Res. BCR* *12*, 206.

Gambari, R. (2011). Recent patents on therapeutic applications of the transcription factor decoy approach. *Expert Opin. Ther. Pat.* *21*, 1755–1771.

Gonçalves, C., Berchel, M., Gosselin, M.-P., Malard, V., Cheradame, H., Jaffrès, P.-A., Guégan, P., Pichon, C., and Midoux, P. (2014). Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection. *Int. J. Pharm.* *460*, 264–272.

Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H.H., and Helenius, A. (2010). Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J. Cell Biol.* *191*, 615–629.

- Immordino, M.L., Dosio, F., and Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine* *1*, 297–315.
- Kang, L., Gao, Z., Huang, W., Jin, M., and Wang, Q. (2015). Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment. *Acta Pharm. Sin. B* *5*, 169–175.
- Leong, P.L., Andrews, G.A., Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N.A., Watkins, S.F., et al. (2003). Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4138–4143.
- Levy, D.E., and Darnell, J.E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 651–662.
- Libermann, T.A., and Zerbini, L.F. (2006). Targeting transcription factors for cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* *6*, 17–33.
- Ling, X., and Arlinghaus, R.B. (2005). Knockdown of STAT3 Expression by RNA Interference Inhibits the Induction of Breast Tumors in Immunocompetent Mice. *Cancer Res.* *65*, 2532–2536.
- Maeda, H. (2010). Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs *via* the EPR Effect: Background and Future Prospects. *Bioconjug. Chem.* *21*, 797–802.
- Mével, M., Neveu, C., Gonçalves, C., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2008a). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 3124–3126.
- Mével, M., Breuzard, G., Yaouanc, J.-J., Clément, J.-C., Lehn, P., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2008b). Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *9*, 1462–1471.
- Pelkmans, L., Bürli, T., Zerial, M., and Helenius, A. (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* *118*, 767–780.
- Perche, F., Gosset, D., Mével, M., Miramon, M.-L., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., Benvegna, T., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2011). Selective gene delivery in dendritic cells with mannosylated and histidylated lipopolyplexes. *J. Drug Target.* *19*, 315–325.
- Rovira-Bru, M., Thompson, D.H., and Szleifer, I. (2002). Size and Structure of Spontaneously Forming Liposomes in Lipid/PEG-Lipid Mixtures. *Biophys. J.* *83*, 2419–2439.
- Sen, M., and Grandis, J.R. (2012). Nucleic acid-based approaches to STAT inhibition. *JAK-STAT* *1*, 285–291.

Sen, M., Thomas, S.M., Kim, S., Yeh, J.I., Ferris, R.L., Johnson, J.T., Duvvuri, U., Lee, J., Sahu, N., Joyce, S., et al. (2012). First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer Discov.* 2, 694–705.

Souissi, I., Najjar, I., Ah-Koon, L., Schischmanoff, P.O., Lesage, D., Le Coquil, S., Roger, C., Dusanter-Fourt, I., Varin-Blank, N., Cao, A., et al. (2011). A STAT3-decoy oligonucleotide induces cell death in a human colorectal carcinoma cell line by blocking nuclear transfer of STAT3 and STAT3-bound NF- κ B. *BMC Cell Biol.* 12, 14.

Wang, J., Lu, M., Qiu, C., and Cui, Q. (2010). TransmiR: a transcription factor–microRNA regulation database. *Nucleic Acids Res.* 38, D119–D122.

Wang, S.-J., Hou, Y.-T., and Chen, L.-C. (2015). A selective decoy-doxorubicin complex for targeted co-delivery, STAT3 probing and synergistic anti-cancer effect. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 51, 13309–13312.

Xi, S., Gooding, W.E., and Grandis, J.R. (2005). In vivo antitumor efficacy of STAT3 blockade using a transcription factor decoy approach: implications for cancer therapy. *Oncogene* 24, 970–979.

Yeung, M.L., Bennasser, Y., LE, S.Y., and Jeang, K.T. (2005). siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. *Cell Res.* 15, 935–946.

Zhang, X., Zhang, J., Wei, H., and Tian, Z. (2007). STAT3-decoy oligodeoxynucleotide inhibits the growth of human lung cancer *via* down-regulating its target genes. *Oncol. Rep.* 17, 1377–1382.

Zhang, X., Liu, P., Zhang, B., Wang, A., and Yang, M. (2010). Role of STAT3 decoy oligodeoxynucleotides on cell invasion and chemosensitivity in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 197, 46–53.

Zheng, C., Zheng, M., Gong, P., Deng, J., Yi, H., Zhang, P., Zhang, Y., Liu, P., Ma, Y., and Cai, L. (2013). Polypeptide cationic micelles mediated co-delivery of docetaxel and siRNA for synergistic tumor therapy. *Biomaterials* 34, 3431–3438.

Zuckerman, J.E., Gritli, I., Tolcher, A., Heidel, J.D., Lim, D., Morgan, R., Chmielowski, B., Ribas, A., Davis, M.E., and Yen, Y. (2014). Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11449–11454.

B. Effet des LPRiD-FA anti-STAT3 chez le petit animal

Sur la base des résultats *in vitro* obtenus avec les siRNA et les leurres moléculaires ADN, nous avons réalisé quelques expériences chez la souris en utilisant les LPRiD-FA (**figure 38**). Etant donné les résultats *in vitro* obtenus précédemment sur la délivrance des siRNA anti-luc dans les métastases pulmonaires 4T1-Luc, nous avons préféré réaliser des injections intratumorales de LPRiD-FA. Pour cela, des souris ont reçu $5 \cdot 10^5$ cellules 4T1 en injection sous-cutanée à proximité de la glande mammaire. Après développement d'une tumeur primaire (7 jours), les souris ont reçu trois injections intratumorales (J_6 , J_9 et J_{12}) de PBS, LPRiD-FA scramble ou LPRiD-FA STAT3.

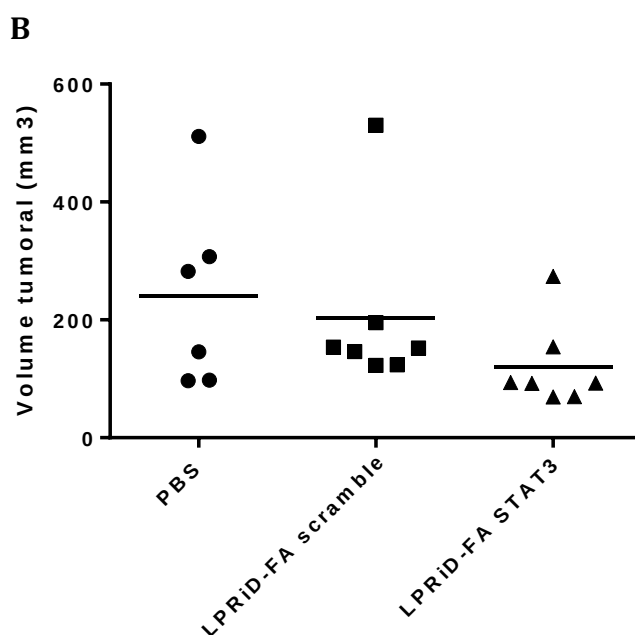
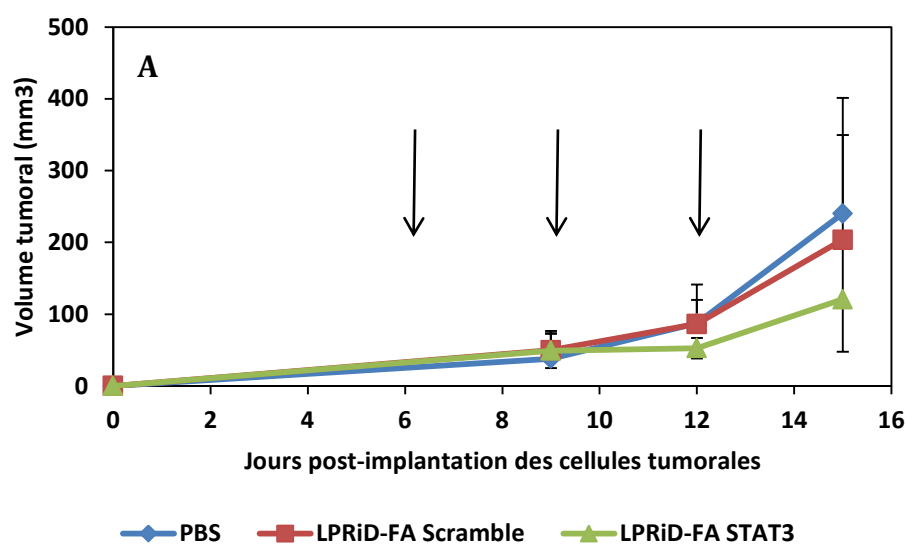


Figure 38 : Effet des LPRiD-FA anti-STAT3 dans des souris portant des tumeurs primaires mammaires 4T1.

Après anesthésie sous isoflurane, les souris ont reçu après développement d'une tumeur primaire 3 traitements différents par injection intratumorale. Le groupe PBS a reçu 50 μ L de PBS, le groupe LPRiD-FA scramble a reçu 50 μ L de lipopolyplexes contenant 10 μ g siRNA scramble + 10 μ g leurre moléculaire ADN scramble, et le groupe LPRiD-FA STAT3 a reçu 50 μ L de lipopolyplexes contenant 10 μ g siRNA anti-STAT3 + 10 μ g leurre moléculaire ADN anti-STAT3. La croissance des tumeurs a été suivie par mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse et les animaux ont été mis à mort par élévation cervicale en fin de protocole.

A/ Evolution de la croissance tumorale moyenne en fonction du traitement reçu. Les flèches indiquent les jours de traitement ; B/ Mesure du volume tumoral individuel en fin d'expérience à J₁₅.

Les résultats de cette première expérience *in vivo* montrent que les LPRiD-FA anti-STAT3 ont induit un retard de la croissance tumorale de manière qui serait significatif. Cependant, ces résultats n'ont pas été reproductibles lors d'autres expériences similaires. Des ajustements de dose ou d'injection sont sûrement nécessaires. Au cours d'une autre expérience réalisée de la même manière et où les effets sur la croissance tumorale n'ont pas été très significatifs, nous avons cependant pu noter après 4 semaines, un début de développement de métastases pulmonaires dans le groupe PBS, alors que ces métastases ont semblé être absentes dans le groupe traité par les LPRiD-FA anti-STAT3.

Nous avons en effet testé la diffusion du liquide dans la tumeur primaire après l'injection d'une solution de PBS contenant du bleu de méthylène (**figure 39**).

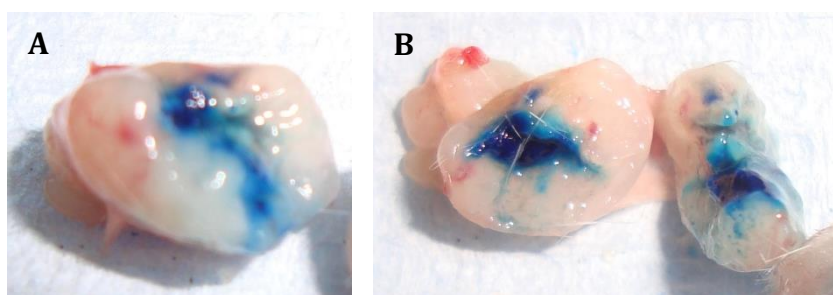


Figure 39 : Coupe de tumeur primaire 4T1 après injection intratumorale de 50 μ L de bleu de méthylène.

Sous anesthésie par inhalation d'isoflurane, des souris ont reçu par injection intratumorale 50 μ L de bleu de méthylène. Au bout de 30 min, les souris ont été mises à mort et la tumeur primaire a été extraite.

A/ Tumeur 4T1 extraite d'une souris ; B/ Coupe de la tumeur sur l'axe longitudinal.

Comme le montre la **figure 39**, le bleu de méthylène permet de visualiser la répartition du liquide injecté dans la tumeur. Nous pouvons remarquer que toute la tumeur n'est pas colorée, toutes les cellules ne sont donc pas atteintes lors de l'injection. Lorsque,

plusieurs injections ont été effectuées avec les LPRiD-FA anti-STAT3, les souris n'ont pas été injectées au même endroit sur la tumeur. Nous pouvons donc supposer que la quasi-totalité de la tumeur a été atteinte mais seulement une seule fois ce qui n'est probablement pas suffisant pour espérer observer un effet très important sur l'inhibition de la croissance tumorale.

La délivrance systémique des LPRiD *via* la circulation sanguine devra être explorée. Les faibles effets antitumoraux que nous avons obtenus ne sont peut-être pas dus aux vecteurs, aux siRNA et aux leurres moléculaires ADN mais plutôt à un problème de délivrance lors des différentes administrations. Aussi, avant de conclure à la faible efficacité de ces acides nucléiques ou de leur vectorisation il serait bon d'approfondir les voies d'administration et notamment de déterminer celle qui permettrait une meilleure délivrance dans les cellules tumorales (dose et nombre de cellules atteintes).

Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont été regroupés dans trois chapitres différents. Dans une première partie, nous avons rapportés des résultats de transfert de siRNA *in vitro* et de biodistribution des lipopolyplexes *in vivo*. Dans une deuxième partie, des lipopolyplexes ciblés par des peptides ont été développés pour le transfert de siRNA dans les cellules 4T1. Dans une troisième partie, nous avons rapporté que le transfert de siRNA anti-STAT3 combiné au transfert de leurre moléculaire ADN anti-STAT3 permet d'obtenir une inhibition de la prolifération des cellules 4T1.

I. Application des LPRi100 *in vivo*

Nos précédents résultats montrent que les lipopolyplexes (LPRi100) constitués de His-lPEI et des Lip100 permettent un transfert de siRNA efficace dans les lignées HeLa, B16F10 et 4T1. Sur cette base, cette formulation a été testée *in vivo*. En premier lieu, des lipopolyplexes fluorescents (polymères ou liposomes) ont été préparés, puis administrés par injection locale (instillation endotrachéale) à des souris ayant des métastases pulmonaires induit par les cellules 4T1 chez la souris. Ces expériences ont montré que les LPRi100 sont bien déposés dans les poumons et qu'ils y résident jusqu'à 24h. Ceci pouvait présumer d'une délivrance efficace de siRNA dans les poumons. Lorsque des siRNA anti-luciférase ont été administrés de manière locale (instillation endotrachéale) à deux reprises à des souris ayant des métastases pulmonaires induites par injection systémique de cellules 4T1-Luc, aucune inhibition du signal de la luciférase n'a été obtenue. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque les siRNA ont été administrés par injection intraveineuse. Dans les deux cas, la dose délivrée était différente : 12,5 µg par instillation endotrachéale et 50 µg en injection intraveineuse. Par instillation endotrachéale, les résultats apportés par la biodistribution indiquant la persistance d'au moins 2 composants de la formulation dans les poumons bien que le suivi du siRNA n'ait pas été effectué. Il est possible que les siRNA n'atteignent pas les cellules cancéreuses. Dans ce cas, l'inhibition de la luciférase ne peut avoir lieu. Le microsyringe pourrait endommager les LPRi lors de leur vaporisation. Cependant, des tests de transfection après vaporisation des LPRi100 ont montré que les complexes ne présentaient pas une variation de taille significative et que leur activité biologique était toujours intacte (résultats non montrés). Gutbier et al., ont testé la

vectorisation des siRNA par instillation endotrachéale chez la souris (Gutbier et al., 2010). La biodistribution des siRNA marqués a été effectuée sans vecteur ou en utilisant des lipoplexes. Ils ont utilisé une formulation de liposomes cationiques (l'AtuFECT01 : beta-L-arginyl-2,3-L-diaminopropionic acid-N-palmityl-N-oleyl-amide trihydrochloride/ 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine/DSPE-PEG2000 50/49/1). Une heure après injection de 9,3 µg de siRNA fluorescents les poumons ont été récupérés et la fluorescence des siRNA a été visualisée par microscopie confocale. Cette étude a montré que les siRNA nus sont déposés dans le parenchyme alvéolaire alors que sous formes lipoplexes, ils sont plutôt localisés dans l'épithélium bronchique et aussi dans les alvéoles. La délivrance de siRNA nu n'a pas permis l'inhibition des gènes de la lamine B et de la VE-cadhérine. Ces siRNA sont trouvés dans le plasma 5 min post-délivrance et sont ensuite éliminés. Dans le cas où les siRNA sont complexés par des liposomes cationiques, les auteurs n'ont pas testé l'efficacité d'inhibition génique mais ont noté un afflux plus important de leucocytes et une prise en charge des lipoplexes par des macrophages alvéolaires et donc une potentielle élimination des complexes.

L'administration systémique par injection intraveineuse permet une délivrance dans les poumons, puisqu'il s'agit des premiers organes atteints avec le cœur après injection. Cependant, les LPRi100 ne sembleraient pas avoir pénétré les cellules cancéreuses 4T1-Luc puisqu'aucune inhibition de la luciférase n'a été mesurée. Comme dit précédemment, ce résultat est à rapprocher de celui de Perche et al, qui a montré que la délivrance systémique de lipopolyplexes ADN/PEG-HpK/Lip100 ne permet pas une rétention du plasmide dans les poumons (Perche et al., 2011a).

Dans les premières expériences *in vivo*, les LPRi employés n'étaient pas pegylés, ils pourraient avoir interagi avec les protéines du surfactant dans les poumons (délivrance locale) ou avec les protéines du sérum dans la circulation sanguine (délivrance systémique).

II. Lipopolyplexes ciblés

Par la suite, nous avons choisi de PEGyler et de cibler ces lipopolyplexes par des ligands spécifiques des cellules 4T1. Ces ligands ont été choisis car ils peuvent déclencher une endocytose récepteur-dépendante et ainsi favoriser l'entrée des siRNA dans les cellules

puis le cytosol. Des lipopolyplexes ont alors été ciblés par les peptides uPA et RGD qui ont été fixés après formation des liposomes.

Des expériences d'endocytose ont permis de mesurer dans certains cas une amélioration apportée par le ciblage des complexes. Le peptide uPA a amélioré l'internalisation des LPD mais son apport sur les autres complexes est moindre (lipoplexes et lipopolyplexes-siRNA). L'endocytose des complexes par cette voie semble être la voie clathrine-dépendante ce qui est en accord avec la littérature sur cette protéine. Cependant, une amélioration de l'efficacité d'endocytose n'est pas forcément synonyme d'une amélioration de l'efficacité de transfection. En effet, bien que les siRNA ne nécessitent pas d'être importés dans le noyau, ils doivent être délivrés dans le cytosol et ensuite être pris en charge par le complexe RISC afin d'exercer leur activité d'inhibition de l'ARNm. Lors de l'endocytose, les complexes transitent dans des vésicules qui vont s'acidifier jusqu'à rupture de celle-ci due à l'effet éponge à protons induit par les vecteurs. L'ajout de monensine a permis de visualiser les vecteurs dans les compartiments acides. C'est dans ce compartiment que les siRNA vont s'échapper et rejoindre le cytosol.

Nous avons remarqué que les résultats d'endocytose diffèrent selon le type de formulation utilisée (liposomes seuls/lipoplexes/lipopolyplexes). En effet, le peptide est situé sur le liposome et celui-ci n'est pas exposé à la surface de la même manière en fonction des complexes avec les acides nucléiques. Il possède la meilleure exposition lorsque le liposome ne contient pas d'acides nucléiques. L'organisation des liposomes avec les acides nucléiques peut modifier l'exposition des peptides sur la surface des lipoplexes résultants. De même, l'organisation supramoléculaire des lipopolyplexes n'est pas la même ce qui peut modifier également l'exposition du peptide couplé sur le liposome. Afin de palier ce problème, il serait possible d'utiliser la click chemistry qui permettrait d'effectuer un couplage de peptide de manière équimolaire entre un groupement azide et un groupement cyclooctyne en un temps relativement court. Cette réaction ne nécessitant pas de purification afin d'éliminer un excès de peptide par rapport au couplage par l'intermédiaire du groupement maléimide, il serait alors possible de coupler un peptide directement sur les complexes, de plus, en utilisant des dérivés cyclooctyne qui ne

nécessitent pas l'utilisation de cuivre. L'étude préliminaire que nous avons effectuée avec un dérivé azide de la fluorescéine a démontré qu'en présence d'un équivalent molaire de dérivé azide incubé durant 1h avec les complexes (lipoplexes/lipopolyplexes) comprenant un lipide cyclooctyne, le couplage est optimal. Cette technique pourrait permettre de coupler des peptides de ciblage après formation des complexes ce qui maximiserait leur exposition en surface pour leur reconnaissance par les cellules 4T1.

Les mesures de l'efficacité *in vitro* de siRNA anti-luciférase transfectés *via* les LPRi ciblés sur les cellules 4T1-Luc a montré en dépit de l'amélioration de l'internalisation des complexes par le peptide uPA, que celle-ci n'est pas très significative en comparaison aux LPRi non ciblés (39 % d'inhibition pour les LPRi100uPA). Par contre elle deviendrait significative si l'on compare aux LPRi ciblés par un peptide non relevant. Toutes les efficacités d'inhibition étaient spécifiques et n'étaient pas dues à de la cytotoxicité. En effet, tous les LPRi ciblés ont entraîné une toxicité qui n'a pas dépassé les 20%.

Par la suite, nous avons utilisé le folate comme ligand des cellules 4T1. L'efficacité de ce ligand a été mesurée par des expériences d'endocytose sur les cellules 4T1 et de transfection de siRNA anti-luciférase sur les 4T1-Luc. L'internalisation des LPRi Folate (LPRi-FA) a montré qu'avec 2% de lipide Folate on obtenait une endocytose deux fois plus efficace à 4h en comparaison aux LPRi100PEG. De même, l'efficacité des siRNA anti-luciférase par les LPRi-FA a été deux fois plus importante (54% d'inhibition) que celle des LPRi100PEG (26% d'inhibition). Il est apparu que 2% de lipide Folate était suffisant pour induire un maximum d'efficacité.

III. Délivrance de siRNA anti-STAT3 et de leurre moléculaire ADN anti-STAT3

Dans la troisième partie nous avons utilisé les LPRi100 pour délivrer des siRNA anti-STAT3 mais également un leurre moléculaire ADN anti-STAT3 afin d'empêcher la prolifération des cellules 4T1. STAT3 est un facteur de transcription notamment impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire et a été mis en cause dans le développement des tumeurs primaires 4T1 (Dai et al., 2011).

Précédemment, les leurres anti-STAT3 ont prouvé leur efficacité *in vitro* (Leong et al., 2003) et *in vivo* (Sen et al., 2012) dans des cellules du cancer de la tête et du cou. Les leurres ADN sont des doubles brins d'ADN et ont une taille proche de celle des siRNA. Leur structure proche leur permet d'être formulés au sein du même lipopolyplexe ce qui permet leur co-délivrance dans les cellules. Pour la première fois, nous avons combiné ces siRNA dirigés contre l'ARNm de STAT3 et un leurre moléculaire ADN dirigé contre la même cible.

Les résultats ont montré que les LPRi formulés avec les siRNA anti-STAT3 permettent l'inhibition significative de la quantité d'ARNm de STAT3 mesuré par semi qPCR (15% d'expression restante). Cette inhibition a également été obtenue *via* les LPRiD (formulation combinée siRNA anti-STAT3 + leurre ADN anti-STAT3) (43% d'expression restante). L'utilisation de LPD leurre ADN anti-STAT3 comme attendu n'a pas eu d'effet sur l'ARNm de STAT3.

Quant au niveau protéique, les LPRi ainsi que les LPRiD ont permis d'induire l'inhibition totale de la protéine STAT3 et de sa forme phosphorylée. Les LPD ont induit une inhibition moindre. Le niveau d'expression de Bcl-xL, un gène dont la transcription est sous le contrôle de STAT3, a également été observé par Western Blot dans les mêmes conditions de transfection. Son expression s'est trouvée inhibée (70% d'inhibition) lors de la co-délivrance des siRNA et des leurres anti-STAT3. La mesure de l'expression protéique d'autres cibles de STAT3, telles que la cycline D1, la survivine ou Twist pourrait également être mesurée.

Lorsque ces formulations ont été testées pour inhiber la prolifération des cellules 4T1, les résultats ont démontré que la codélivrance siRNA + leurre ADN LPRiD permettait d'obtenir la plus grande inhibition de la prolifération. Une inhibition de la prolifération a également été obtenue avec les leurres ADN seuls. En revanche, malgré l'efficacité des siRNA anti-STAT3 pour inhiber l'ARNm et la protéine STAT3, ces siRNA n'ont pas eu d'effet sur la prolifération cellulaire. Le faible effet des siRNA seuls sur la prolifération cellulaire avait déjà été rapportée par Tian et. al, où la transfection de siRNA anti-STAT3 par la Lipofectamine 2000 n'avait pas entraîné de baisse de la prolifération cellulaire dans la lignée 4T1 (Tian et al., 2012).

Seule la co-délivrance siRNA + leurre ADN anti-STAT3 a permis d'induire l'apoptose des cellules 4T1 comparativement aux molécules utilisées séparément. En conclusion, la co-délivrance de ces deux molécules par les lipopolyplexes pourrait s'avérer être une stratégie d'intérêt pour l'inhibition de la prolifération cellulaire. Une étude sur les effets synergiques de ces deux molécules serait nécessaire pour mieux comprendre le(s) mécanisme(s) sous jacents.

Les résultats préliminaires *in vivo* que nous avons obtenus bien que peu satisfaisants sont encourageants compte tenu des difficultés à maîtriser la croissance de la tumeur 4T1 qui progresse très rapidement parfois et parfois très faiblement mais aussi la délivrance de quantité suffisante de siRNA et de leurre moléculaire ADN par injection intratumorale.

La co-délivrance de siRNA et de leurre moléculaire ADN n'a jamais été effectuée auparavant. Contrairement à la co-délivrance d'acides nucléiques avec des molécules chimiothérapeutiques qui possèdent des propriétés physicochimiques très différentes des acides nucléiques, les leurres moléculaires ADN et les siRNA présentent l'avantage d'avoir des structures similaires et donc de pouvoir être co-délivrés dans le même vecteur. Les lipopolyplexes ont prouvé *in vitro* leur efficacité dans la délivrance de ces molécules avec une cytotoxicité faible. Néanmoins, les effets synergiques des siRNA et des leurres restent à explorer. Les siRNA utilisés ici avaient une structure chimique classique (non modifiés). L'utilisation de siRNA modifiés chimiquement pourrait améliorer leur stabilité en milieu extra et intracellulaire et par conséquent leur efficacité *in vivo*. De même, l'utilisation de minicercles ADN (leurres moléculaires circulaires plus stables) développés au laboratoire pourrait être utilisés. De plus, plusieurs sites peuvent être incorporés dans les minicercles ADN.

De façon générale, les résultats présentés dans ce manuscrit indiquent que les lipopolyplexes sont une formulation prometteuse pour les petits acides nucléiques (siRNA et leurre ADN). Une formulation efficace nécessite de développer une nouvelle approche de la fixation de la molécule ciblant sur les nanoparticules. La co-délivrance de siRNA et de leurre ADN est une combinaison qui mérite d'être plus évaluée pour réduire la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant, un effort important est à réaliser pour maîtriser les voies d'administrations des lipopolyplexes ainsi que la dose de siRNA et de leurre ADN capable d'être délivrée au sein de la tumeur.

Matériel et méthodes

1. Réactifs

Tous les réactifs non spécifiés ont été achetés chez Sigma (St. Quentin Fallavier, France) et utilisés sans purification supplémentaire. La polyéthylèneimine linéaire substituée par 16% de résidus histidine (HislPEI; MM=34,5 kDa) a été produite par Polytheragene (Génopole, Evry, France) selon (Bertrand et al., 2011). Les lipides O,O-dioleyle-N-[3N-(N-méthylimidazolium iodide)propylène] phosphoramidate (KLN25; MM = 787 Da), O,O-dioleyle-N-histamine phosphoramidate (MM27; MM = 692 Da), le lipophosphoramidate-TEG-fluorescéine (O,O-dioleyle-phosphoramidate-fluorescéine ; MM : 1018 Da), et le lipophosphoramidate fluorescent BSV95 (O,O-dioleyle-phosphoramidate-chlorocyanine IR 806 ; MM : 1569 Da) (**figure 32**, généralités page 64) et **figure 1**) ont été produits par Mathieu Berchel (CEMCA, CNRS UMR 6521, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, France) selon (Mével et al., 2008a, 2008b; Berchel et al., 2011). DSPE-PEG2000-Maléimide (MAL), DSPE-PEG2000 (PEG), DSPE-PEG2000-Dibenzocyclooctyl (DBCO), DSPE-PEG2000-Folate (FA) ont été achetés chez Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, Alabama, US).

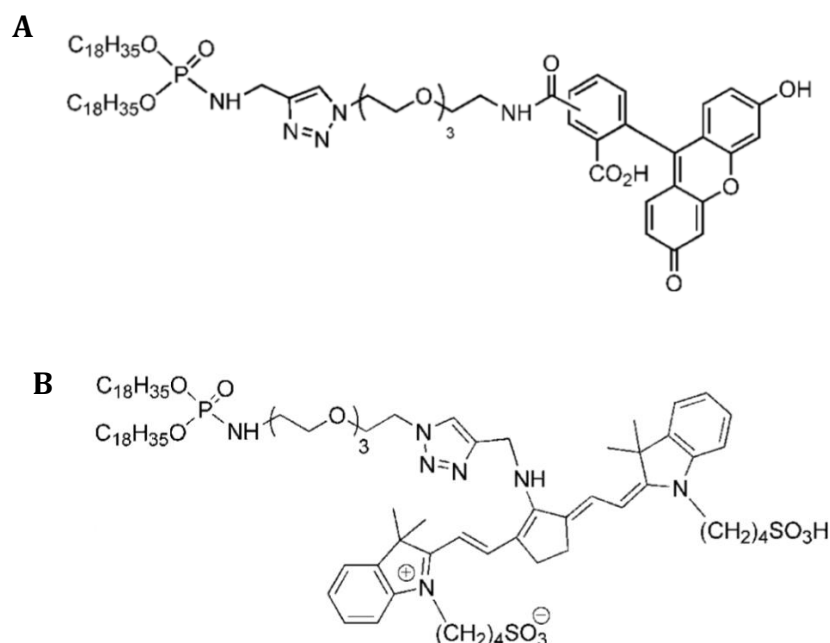


Figure 1 : Structure des lipides fluorescents.

A/ Lipophosphoramidate-TEG-Fluorescéine, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ nm}$; B/ Lipophosphoramidate fluorescent BSV95, $\lambda_{\text{ex}} : 675 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}} : 720 \text{ nm}$ (Berchel et al., 2011).

2. Préparation des liposomes

Les liposomes Lip100 (KLN25/MM27 ; 50% :50% ; mol/mol), Lip100MAL (KLN25/MM27/DSPE-PEG2000-Maléimide; 47,5% :47,5% : 5% ; mol/mol/mol), Lip100PEG (KLN25/MM27/DSPE-PEG2000 ; 47,5% :47,5% : 5% ; mol/mol/mol), Lip100DBCO (KLN25/MM27/ DSPE-PEG2000-Dibenzocyclooctyl ; 47,5% :47,5% : 5% ; mol/mol/mol), Lip100-FA 0.5% (KLN25/MM27/DSPE-PEG2000/DSPE-PEG2000-Folate ; 47,5% :47,5% : 4.5% : 0,5% ; mol/mol/mol) , Lip100-FA 1% (KLN25/MM27/DSPE-PEG2000/DSPE-PEG2000-Folate ; 47,5% :47,5% : 4% : 1% ; mol/mol/mol), Lip100-FA 2% (KLN25/MM27/DSPE-PEG2000/DSPE-PEG2000-Folate ; 47,5% :47,5% : 3% : 2% ; mol/mol/mol) sont préparés à 5,4 mM en mélangeant les différents lipides dans de l'éthanol. Les solutions dans l'éthanol sont ensuite évaporées pour créer un film lipidique qui est ensuite hydraté pendant 12h à 4°C dans 0,5 mL de tampon Hepes 10 mM pH 7,4 (HEPES). Enfin, les liposomes sont vortexés et soniqués pendant 10 min à 37kHz en utilisant un bain à ultrasons (Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les liposomes sont ensuite dialysés dans des boudins de dialyse (Dialysis Tubing Cellulose, MWCO de 12,4 kDa) à 4°C durant 1 nuit contre 500 mL d'HEPES, puis encore 8h après changement de tampon.

3. siRNA et ADN plasmidique

Les siRNA ont été conçus et achetés chez GE Dharmacon (GE Dharmacon, Lafayette, Colorado). Les séquences sens des siRNA scramble et anti-LucGL4 sont respectivement 5' AUGUCUACUGGCAGUCCUGTT 3', 5' GGACGAGGACGAGCACUUCTT 3'. L'ADN plasmidique utilisé est le plasmide pTG11033 (pCMV-Luc; 9514 bp, Transgène S.A., Strasbourg, France) qui code pour le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur CMV du cytomégalovirus.

4. Formation des complexes siRNA

a) Polyplexes

500 µL de polyplexes sont préparés à un rapport massique siRNA/His-lPEI (µg/µg) 1/3 à une concentration finale de 50nM siRNA selon : 5 µL de siRNA (0,35 µg à 50 µM) sont dilués dans 2,1 µL d'HEPES, puis 2,1 µL de His-lPEI (0,5 mg/mL) sont ajoutés. La solution

est vortexée pendant 4s puis est laissée au repos pendant 30 min à température ambiante. La solution est enfin ajustée à 500 μ L avec du milieu de culture sans SVF (Sérum de Veau Fœtal).

b) Lipoplexes

500 μ L de lipoplexes sont préparés à un rapport de charge acide nucléique/liposome 1/2 à une concentration finale de 50nM siRNA selon : 5 μ L de siRNA (0,35 μ g à 50 μ M) sont dilués dans 2,1 μ L d'HEPES. Les liposomes (4,2 μ L à 0,54 mM) sont dilués dans 195,8 μ L d'HEPES. La solution de siRNA est ajoutée à celle des liposomes, homogénéisée par aspiration-refoulement à la pipette, et laissée au repos pendant 30 min à température ambiante. La solution est enfin ajustée à 500 μ L avec du milieu sans SVF.

Pour 500 μ L de lipoplexes ADN à un rapport de charge 1/2 avec 2,5 μ g d'ADN: 2,5 μ L d'ADN (1 mg/mL) sont dilués dans 15 μ L d'HEPES. Les liposomes (3 μ L à 5,4 mM) sont dilués dans 197 μ L d'HEPES. La solution d'ADN est ajoutée à celle des liposomes, homogénéisée par aspiration-refoulement avec la pipette, et laissée pendant 30 min à température ambiante. La solution est enfin ajustée à 500 μ L avec du milieu de culture sans SVF.

c) Lipopolyplexes

500 μ L de lipopolyplexes sont préparés à un rapport acide nucléique/polymère/liposome (μ g : μ g :charge) de 1/3/2 à une concentration finale de 50 nM de siRNA selon: 5 μ L de siRNA (0,35 μ g à 50 μ M) sont dilués dans 2,1 μ L d'HEPES, puis 2,1 μ L de PTG1 (0,5 mg/mL) sont ajoutés sur la solution de siRNA (rapport massique siRNA/polymère de 1/3). Après 10s de vortex, les complexes sont laissés au repos 30 min à température ambiante. Ensuite, 4,2 μ L de liposomes (0,54 mM) dilués dans 195,8 μ L d'HEPES sont ajoutés sur les polyplexes (rapport de charge siRNA/liposomes de 1/2) et la solution est homogénéisée par aspiration-refoulement avec la pipette. Après 15 min au repos, la solution est ajustée à 500 μ L dans du milieu de culture sans SVF.

Pour 500 μ L de lipopolyplexes ADN préparés au même rapport 1/3/2 avec 2,5 μ g d'ADN : 2,5 μ L d'ADN (1mg/mL) sont dilués dans 15 μ L d'HEPES puis 15 μ L de His-IPEI (0,5 mg/mL), sont ajoutés sur la solution d'ADN (rapport massique 1/3). Après 10s de vortex, les complexes sont laissés au repos 30 min à température ambiante. Ensuite, 3 μ L de liposomes (5,4 mM) dilués dans 197 μ L d'HEPES sont ajoutés sur le polyplexe (rapport de

charge: 1/2) et la solution est homogénéisée par aspiration-refoulement avec la pipette. Après 15 min au repos, la solution est ajustée à 500 µL dans du milieu de culture sans SVF.

5. Couplage des peptides

Les peptides utilisés sont le peptide RGDc (Mw : 578,7 Da, PCI-3686-PI, Peptides International, Louisville, Etats-Unis), uPA (séquence : VSNKYFSNIHWC, Mw : 1497 Da, JPT, Berlin, Allemagne), ASSLNIAC (MM : 777 Da, PolyPeptide group, Strasbourg, France) et CASSLNIA (MM : 777 Da, PolyPeptide group). Cinq équivalents molaires (rapportés à la quantité de lipide maléimide contenue dans le Lip100MAL) de ces peptides possédant une fonction thiol sont repris dans 0,5 mL de tampon HEPES 10 mM, pH 7,4 contenant 2 mM de DTT. Les peptides sont ensuite mélangés à 0,5 mL de Lip100MAL 5,4 mM dans tampon HEPES 10 mM, pH 7,4 et la réaction de couplage est effectuée à 4°C pendant une nuit sous agitation douce. Les liposomes sont ensuite dialysés comme décrit précédemment contre 500 mL d'HEPES, afin d'éliminer l'excès de peptide non couplé.

Les liposomes doublement ciblés avec uPA/RGDc ou ASSLNIAC/RGDc sont obtenus après préparation séparée des deux types de liposomes. Cinq cents µL de chaque liposome (à 2,7 mM) sont mélangés dans un cryotube qui est mis à -20°C pendant 2h puis à -80°C pendant 2h. Les liposomes sont ensuite lyophilisés. Le lyophilisat est ensuite repris dans 500 µL d'éthanol puis évaporés à sec au rotavapor afin de faire un nouveau film lipidique. Celui-ci est finalement repris dans 500 µL d'HEPES afin d'obtenir des liposomes doublement ciblés à la concentration de 5,4 mM.

6. Couplage de ligand *via* click chemistry

Le fluorophore 5-FAM-Azide (N-(3-azidopropyl)-3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-5-carboxamide, MM : 460,4 g/mol ; CLK-80101, Jena Bioscience, Thüringen, Allemagne) est solubilisé à 1 mg/mL dans du DMSO. Le couplage du 5-FAM-Azide est réalisé en incubant un équivalent molaire du fluorophore (rapporté à la quantité de lipide DBCO) avec les liposomes. Pour ceci, 12,4 µL de 5-FAM-Azide dilués dans 40 µL d'HEPES sont ajoutés à 100 µL de liposomes, puis le mélange est incubé pendant différents temps à température ambiante sous agitation douce. Le couplage du 5-FAM-Azide sur les lipoplexes ou lipopolyplexes contenant 5 µg d'acides nucléiques (siRNA

ou ADN pTG11033) est réalisé de la même manière (un équivalent molaire 5-FAM rapporté à la quantité de lipide DBCO). Brièvement, dans le cas des lipoplexes, 5 µg d'acides nucléiques sont dilués dans 20 µL d'HEPES. Six µL de liposomes à 5,4mM sont également dilués dans 20 µL d'HEPES. L'acide nucléique est mélangé à la solution de liposome et est mise au repos pendant 30 min. Ensuite, 7,4 µL de 5-FAM-Azide (0,1 mg/mL), dilués dans 20 µL d'HEPES sont ajoutés aux lipoplexes. La solution est mise sous agitation douce à température ambiante pendant différents temps. Dans le cas des lipopolyplexes, 5 µg d'ADN sont dilués dans 10 µL d'HEPES, et 30 µL de His-lPEI (0,5mg/mL) y sont ajoutés. La solution est vortexée durant 4s et est mise au repos pendant 15 min. Les liposomes (6 µL dilués dans 20 µL d'HEPES) sont ajoutés à la solution de polyplexes. Ensuite, 7,4 µL de 5-FAM-Azide (0,1 mg/mL), dilués dans 20 µL d'HEPES sont ajoutés au lipopolyplexe. La solution est mise sous agitation douce à température ambiante pendant différents temps.

Aucune purification n'est effectuée par la suite.

7. Caractérisation des formulations

a) Mesure de la taille et du potentiel ζ

La taille et le potentiel ζ des différentes formulations sont mesurés respectivement par diffusion dynamique de la lumière et mesure de la mobilité électrophorétique, avec le SZ-100 Nanopartica (Horiba, Les Ulis, France). Les mesures sont calibrées avec des nanosphères de latex de 204 nm et des solutions standard de potentiel ζ .

b) Gel retard

Les complexes sont réalisés comme décrit précédemment avec 1 µg d'acide nucléique. Ils sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 2% (complexes siRNA) ou 0,6% (complexes ADN) et mis à migrer dans un tampon Tris-borate-EDTA buffer (95 mM Tris, 89 mM acide borique, 2,5 mM EDTA, and 10 mM DTT, pH 8.6) à 100V pendant 45 min. Les acides nucléiques sont visualisés sous UV grâce à la présence de bromure d'éthidium dans le gel.

c) Spectres ^1H RMN

Les spectres RMN des lipides (KLN25 et MM27) sont réalisés après séchage des lipides dans une étuve sèche durant 1 nuit puis dissolution à 1mM dans du chloroforme deutéré (CDCl_3).

Les spectres RMN des liposomes sont réalisés après dialyse. ceux-ci sont congelés à -20°C pendant 2h puis à -80°C pendant 2h et sont lyophilisés avant d'être dissous à 1 mM dans du chloroforme deutéré (Lip100) ou dans du DMSO deutéré ($\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) (Lip100MAL et Lip100uPA).

Le spectre RMN du peptide uPA est réalisé après solubilisation du peptide à 1 mM dans du DMSO deutéré.

Les spectres sont réalisés sur un spectromètre RMN BRUKER 600MHz.

8. Lignées cellulaires et culture cellulaire

La lignée cellulaire 4T1 a été obtenue chez ATCC (ATCC® CRL-2539™, Rockville MD, Etats-Unis). La lignée cellulaire 4T1-Luc a été obtenue par transfection avec des particules lentivirales contenant le gène luciférase. Brièvement, un surnageant contenant 10^6 particules virales et du polybrene à une concentration finale de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ont été déposés sur 10^5 cellules 4T1 adhérentes et incubés pendant 24h à 37°C 5% CO_2 . Les cellules ont ensuite été sélectionnées en les cultivant en présence de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ de puromycine. Les cellules 4T1 ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVF) et 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules 4T1 sont entretenues dans le même milieu mais en présence de $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ de puromycine. Les cellules MCEC (cellules endothéliales cardiaque; CLU510; Cedarlane, Burlington, Canada) sont cultivées dans du milieu DMEM 1g/L glucose supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVF), 1% de pénicilline/streptomycine et 0,1% de NaOH (1 M). Les cellules C212 (cellules musculaires squelettiques ; CRL1772; ATCC, Rockville, MD, USA) sont cultivées dans du milieu DMEM 4,5g/L glucose supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVF) et 1% de pénicilline/streptomycine. Les C2C12 sont différenciées en les déposant à une concentration de 2.10^5 cellules dans des plaques de 24 puits et en les cultivant durant 7

jours dans du milieu DMEM 4,5g/L glucose supplémenté par 2% de sérum de cheval et 1% de pénicilline/streptomycine.

9. Internalisation

Les cellules sont déposées la veille de l'expérience dans des plaques 24 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules pour les 4T1 et les MCEC. Les C2C12 ($2 \cdot 10^5$) sont déposées 7 jours avant, afin de permettre leur différenciation. Les liposomes et les complexes (lipoplexes et lipopolyplexes) sont incubés avec les cellules à différents temps. Les cellules sont décollées par de la trypsine, récoltées dans des tubes pour la cytométrie en flux et lavées avec du PBS. La fluorescence associée aux cellules est mesurée par cytométrie en flux (FACSort; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) avec $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ nm}$. L'intensité de la fluorescence de la fluorescéine est exprimée selon la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) de 5000 cellules. Chaque condition est analysée 3 fois : le premier passage a permis de mesurer la fluorescence totale, pour le second passage, du bleu trypan à une concentration finale de 0,004% a été ajouté afin d'éteindre la fluorescence de la fluorescéine associée à la surface des cellules. Enfin, un troisième passage est réalisé, après ajout de la monensine à une concentration finale de 0,03 mg/mL et incubation durant 30 min avant la mesure de la fluorescence. La monensine permet la neutralisation du pH des compartiments acides afin de visualiser la fluorescence de la fluorescéine éteinte dans les compartiments intracellulaires acides (Monsigny et al., 1984; Midoux et al., 1986).

10. Transfection avec des siRNA

Les cellules 4T1-Luc sont déposées la veille à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules dans des plaques 24 puits. Lorsque les cellules sont à 80% confluentes, les complexes sont réalisés comme décrit précédemment puis déposés sur les cellules. Ils sont incubés pendant 24h, puis le milieu de culture est éliminé et remplacé par 1 mL de milieu complet sans complexes pour une incubation pendant une autre période de 24h.

11. Mesure de l'activité luciférase

Après 48h, les cellules sont trypsinées puis lavées avec du PBS. L'activité luciférase est quantifiée en utilisant le kit Promega luciferase assay system E1500 (Promega, Fitchburg, Wisconsin, Etats-Unis) et le luminomètre LUMAT LB 9507. L'activité luciférase est ensuite normalisée par rapport à la quantité de protéine en réalisant un dosage de protéine avec le kit BCA protein assay (Uptima, Interchim SA, Montluçon, France) et la sérum albumine bovine. L'activité luciférase est finalement exprimée en RLU/mg de protéine. Le pourcentage d'inhibition spécifique de la luciférase est exprimé en retranchant le pourcentage d'inhibition obtenu avec le siRNA scramble.

12. Mesure de la viabilité cellulaire

Les cellules sont transfectées par les différentes formulations comme indiqué précédemment. A 48h post-transfection, 100 μ L de MTT (5mg/mL) sont ajoutés par puits de culture cellulaire. Après 4h d'incubation à 37°C, le milieu est retiré et les cellules sont lavées avec du PBS. Les sels de formazan sont ensuite solubilisés dans 1 mL d'isopropanol acidifié (0,04 M HCl) et 200 μ L de SDS 3%. La coloration est ensuite homogénéisée et l'absorbance est mesurée à 560 nm avec un spectrophotomètre (Victor, Perkin Elmer, Waltham, MA). Le pourcentage de viabilité cellulaire est exprimé en fonction du contrôle (cellules ayant subi les mêmes manipulations en absence de complexes).

13. Expériences *in vivo*

a) Biodistribution des lipopolyplexes

Les lipopolyplexes sont préparés avec 12,5 μ g de siRNA et un mélange polymère/liposomes fluorescent lyophilisé. Brièvement, 400 μ L de His-lPEI (1 mg/mL), 100 μ L de Lip100 fluorescent à 5,4 mM et 100 μ L de tréhalose (400 mg/mL d'HEPES) sont mélangés pendant 1h puis lyophilisés. Les liposomes fluorescents (KLN25/MM27/BSV95 ; 49% : 49% : 2% ; mol : mol : mol) sont préparés avec le lipophosphoramidate BSV95. De la même manière, des polyplexes fluorescents ont été préparés avec la HislPEI fluorescente préparée au laboratoire: 400 μ L de HislPEI-Dylight800 (fluorophore émettant dans le proche infrarouge, λ_{ex} : 777 nm- λ_{em} : 794 nm) (1 mg/mL) (ThermoFisher, Waltham, MA) (**figure 2**), 100 μ L de Lip100 à 5,4 mM et 100 μ L de tréhalose (400 mg/mL d'HEPES)

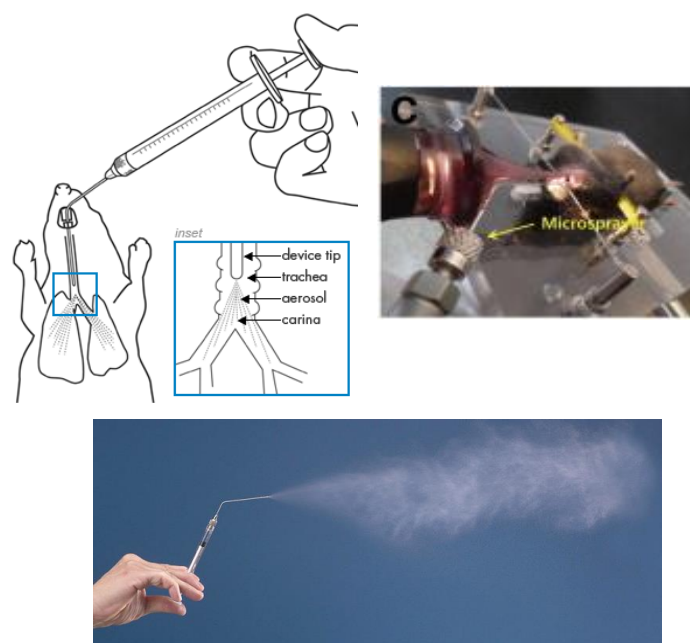


Figure 3: Instillation endotrachéale chez la souris.

La souris anesthésiée est inclinée à 45°C. Le Microsprayer® est introduit dans la trachée par visualisation grâce à un otoscope et les formulations sont vaporisées.

b) Inhibition de la luciférase

Ces expériences ont été réalisées au CIPA, des souris (femelles Balb/c de 8 semaines), ont été hébergées à l'animalerie du CIPA, à 22°C, pendant au moins 1 semaine avant les expérimentations. Les expériences ont été réalisées sous l'accreditation du laboratoire CIPA (numéro d'agrément : C-45-234-6, responsable Yann Hérault). A J₀, les souris ont reçu 10⁶ cellules 4T1-Luc par injection intraveineuse dans la veine caudale. Après vérification à J₃ de la présence de métastases expérimentales dans les poumons par imagerie de bioluminescence avec l'imageur Ivis Lumina, les souris ont reçu les formulations de siRNA à J₆ et à J₈. Un groupe de 5 souris a reçu 50 µg de siRNA anti-Luc (3,7 µL à 1 mM dilués dans 100 µL d'eau RNase free) formulés avec la formulation lyophilisée HislPEI-Lip100 (100 µL). Ce complexe est incubé durant 30 min à température ambiante, puis administré par injection intraveineuse. Un deuxième groupe de 5 souris a reçu 12,5 µg de siRNA anti-Luc (0,92 µL à 1mM dilués dans 25 µL d'eau RNase free) formulés avec 25 µL de HislPEI-Lip100 lyophilisé par instillation endotrachéale après anesthésie par inhalation d'isoflurane. Le suivi de l'efficacité des siRNA anti-Luc a été effectué en réalisant des imageries de bioluminescence à J₆, J₈, J₉, J₁₀ et J₁₃. En fin d'expérience les souris sont mises à mort par dislocation cervicale.

c) Inhibition de la prolifération tumorale par les LPRi-FA anti-STAT3

Ces expériences ont été réalisées au CBM, des souris (femelles Balb/c de 8 semaines), ont été hébergées à l'animalerie du CBM, à 22°C, pendant au moins 1 semaine avant les expérimentations. Les expériences ont été réalisées sous l'accréditation du laboratoire CBM (numéro d'agrément : C45-234-12, responsable Chantal Pichon). Après anesthésie par de l'isoflurane, à J₀, les souris ont reçu 5.10⁵ cellules 4T1 par injection sous-cutanée à proximité de la glande mammaire. 1 semaine après le développement d'une tumeur primaire, les souris ont reçu après anesthésie par de l'isoflurane, 3 traitements différents par injection intratumorale. Le groupe PBS a reçu 50 µL de PBS, le groupe LPRiD-FA scramble a reçu 50 µL de lipopolyplexes contenant 10 µg siRNA scramble (1mM) + 10 µg leurre moléculaire ADN scramble (1mM), et le groupe LPRiD-FA STAT3 a reçu 50 µL de lipopolyplexes contenant 10 µg siRNA anti-STAT3 (1mM) + 10 µg leurre moléculaire ADN anti-STAT3 (1mM). Les traitements ont été effectués aux jours 6, 9 et 12. La croissance des tumeurs a été suivie par mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse et les animaux ont été mis à mort par élongation cervicale en fin de protocole.

Références bibliographiques

- Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* *9*, 799–808.
- Agard, N.J., Prescher, J.A., and Bertozzi, C.R. (2004). A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 15046–15047.
- Akira S. (2000). Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* *19*, 2607–2611.
- Altanerova, V., Cihova, M., Babic, M., Rychly, B., Ondicova, K., Mravec, B., and Altaner, C. (2012). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosinedeaminase::uracil phosphoribosyltransferase inhibit intracerebral rat glioblastoma. *Int. J. Cancer* *130*, 2455–2463.
- Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* *17*, 1497–1506.
- Antony, A.C., Tang, Y.-S., Khan, R.A., Biju, M.P., Xiao, X., Li, Q.-J., Sun, X.-L., Jayaram, H.N., and Stabler, S.P. (2004). Translational upregulation of folate receptors is mediated by homocysteine *via* RNA-heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 interactions. *J. Clin. Invest.* *113*, 285–301.
- Appella, E., Robinson, E.A., Ullrich, S.J., Stoppelli, M.P., Corti, A., Cassani, G., and Blasi, F. (1987). The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J. Biol. Chem.* *262*, 4437–4440.
- Aranda, C., Urbiola, K., Méndez Ardoy, A., García Fernández, J.M., Ortiz Mellet, C., and de Ilarduya, C.T. (2013). Targeted gene delivery by new folate–polycationic amphiphilic cyclodextrin–DNA nanocomplexes in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *85*, 390–397.
- Asseline, U., Gonçalves, C., Pichon, C., and Midoux, P. (2014). Improved nuclear delivery of antisense 2'-Ome RNA by conjugation with the histidine-rich peptide H5WYG. *J. Gene Med.* *16*, 157–165.
- Atkins, G.J., Fleeton, M.N., and Sheahan, B.J. (2008). Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors. *Expert Rev. Mol. Med.* *10*, e33.
- Bader, A.G., Brown, D., Stoudemire, J., and Lammers, P. (2011). Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther.* *18*, 1121–1126.
- Balazs, D.A., and Godbey, W.T. (2010). Liposomes for Use in Gene Delivery. *J. Drug Deliv.* *2011*, e326497.
- Barenholz, Y. (2001). Liposome application: problems and prospects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* *6*, 66–77.

- Bartlett, D.W., and Davis, M.E. (2007). Physicochemical and biological characterization of targeted, nucleic acid-containing nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* *18*, 456–468.
- Bartlett, D.W., Su, H., Hildebrandt, I.J., Weber, W.A., and Davis, M.E. (2007). Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15549–15554.
- Baselga, J. (2001). Clinical trials of Herceptin(trastuzumab). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *37 Suppl 1*, S18–S24.
- Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., Lo, A., Codelli, J.A., and Bertozzi, C.R. (2007). Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16793–16797.
- Behlke, M.A. (2008). Chemical Modification of siRNAs for In Vivo Use. *Oligonucleotides* *18*, 305–320.
- Bellocq, N.C., Pun, S.H., Jensen, G.S., and Davis, M.E. (2003). Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjug. Chem.* *14*, 1122–1132.
- Berchel, M., Haelters, J.-P., Couthon-Gourvès, H., Deschamps, L., Midoux, P., Lehn, P., and Jaffrès, P.-A. (2011). Modular Construction of Fluorescent Lipophosphoramidates by Click Chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* *31*, 6294–6303.
- Berger, C.M., Gaume, X., and Bouvet, P. (2015). The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* *113*, 78–85.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.
- Bertrand, E., Gonçalves, C., Billiet, L., Gomez, J.P., Pichon, C., Cheradame, H., Midoux, P., and Guégan, P. (2011). Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun.* *47*, 12547.
- Bielinska, A., Shivdasani, R.A., Zhang, L.Q., and Nabel, G.J. (1990). Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* *250*, 997–1000.
- Billiet, L., Gomez, J.-P., Berchel, M., Jaffrès, P.-A., Le Gall, T., Montier, T., Bertrand, E., Cheradame, H., Guégan, P., Mével, M., et al. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* *33*, 2980–2990.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U., and Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 14428–14433.
- Birchall, J. (2007). Pulmonary delivery of nucleic acids. *Expert Opin. Drug Deliv.* *4*, 575–578.
- Blume, G., and Cevc, G. (1990). Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* *1029*, 91–97.

- Botosoa, E.P., Maillason, M., Mougín-Degraef, M., Remaud-Le Saëc, P., Gestin, J.-F., Jacques, Y., Barbet, J., and Faivre-Chauvet, A. (2011). Antibody-Hapten Recognition at the Surface of Functionalized Liposomes Studied by SPR: Steric Hindrance of Pegylated Phospholipids in Stealth Liposomes Prepared for Targeted Radionuclide Delivery. *J. Drug Deliv.* *2011*, 368535.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 7297–7301.
- Brown, K.M., Chu, C.-Y., and Rana, T.M. (2005). Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 469–470.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* *296*, 550–553.
- Caswell, P.T., Vadrevu, S., and Norman, J.C. (2009). Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 843–853.
- Chakravarty, R., Chakraborty, S., and Dash, A. (2015). Molecular Imaging of Breast Cancer: Role of RGD Peptides. *Mini Rev. Med. Chem.* *15*, 1073–1094.
- Chan, C.-L., Majzoub, R.N., Shirazi, R.S., Ewert, K.K., Chen, Y.-J., Liang, K.S., and Safinya, C.R. (2012). Endosomal Escape and Transfection Efficiency of PEGylated Cationic Lipid–DNA Complexes Prepared with an Acid-Labile PEG-Lipid. *Biomaterials* *33*, 4928–4935.
- Chanan-Khan, A. (2005). Bcl-2 antisense therapy in B-cell malignancies. *Blood Rev.* *19*, 213–221.
- Chen, D., Liu, W., Shen, Y., Mu, H., Zhang, Y., Liang, R., Wang, A., Sun, K., and Fu, F. (2011). Effects of a novel pH-sensitive liposome with cleavable esterase-catalyzed and pH-responsive double smart mPEG lipid derivative on ABC phenomenon. *Int. J. Nanomedicine* *6*, 2053–2061.
- Chen, D., Sun, K., Mu, H., Tang, M., Liang, R., Wang, A., Zhou, S., Sun, H., Zhao, F., Yao, J., et al. (2012a). pH and temperature dual-sensitive liposome gel based on novel cleavable mPEG-Hz-CHEMS polymeric vaginal delivery system. *Int. J. Nanomedicine* *7*, 2621–2630.
- Chen, M., Gao, S., Dong, M., Song, J., Yang, C., Howard, K.A., Kjems, J., and Besenbacher, F. (2012b). Chitosan/siRNA nanoparticles encapsulated in PLGA nanofibers for siRNA delivery. *ACS Nano* *6*, 4835–4844.
- Chen, Y., Bathula, S.R., Yang, Q., and Huang, L. (2010). Targeted nanoparticles deliver siRNA to melanoma. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 2790–2798.
- Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., and Ford, L.P. (2005). Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* *33*, 1290–1297.
- Chi, K.N., Gleave, M.E., Klasa, R., Murray, N., Bryce, C., Lopes de Menezes, D.E., D'Aloisio, S., and Tolcher, A.W. (2001). A phase I dose-finding study of combined treatment with an

antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 3920–3927.

Chi, Q., Wang, G., and Jiang, J. (2013). The persistence length and length per base of single-stranded DNA obtained from fluorescence correlation spectroscopy measurements using mean field theory. *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* 392, 1072–1079.

Chiu, Y.-L., and Rana, T.M. (2003). siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA N. Y. N* 9, 1034–1048.

Chou, L.Y.T., Ming, K., and Chan, W.C.W. (2011). Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 40, 233–245.

Choung, S., Kim, Y.J., Kim, S., Park, H.-O., and Choi, Y.-C. (2006). Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 919–927.

Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., et al. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet Lond. Engl.* 378, 595–605.

Cooney, M., Czernuszewicz, G., Postel, E.H., Flint, S.J., and Hogan, M.E. (1988). Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene in vitro. *Science* 241, 456–459.

Cui, W., Ning, J., Naik, U.P., and Duncan, M.K. (2004). OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput. Methods Programs Biomed.* 75, 67–73.

Cun, D., Foged, C., Yang, M., Frøkjær, S., and Nielsen, H.M. (2010). Preparation and characterization of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. *Int. J. Pharm.* 390, 70–75.

Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygün, H., Klippel, A., Pronk, G.J., Giese, K., and Kaufmann, J. (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 2705–2716.

Czekay, R.-P., Kuemmel, T.A., Orlando, R.A., and Farquhar, M.G. (2001). Direct Binding of Occupied Urokinase Receptor (uPAR) to LDL Receptor-related Protein Is Required for Endocytosis of uPAR and Regulation of Cell Surface Urokinase Activity. *Mol. Biol. Cell* 12, 1467–1479.

Dai, L., Cheng, L., Zhang, X., Jiang, Q., Zhang, S., Wang, S., Li, Y., Chen, X., Du, T., Yang, Y., et al. (2011). Plasmid-based STAT3-siRNA efficiently inhibits breast tumor growth and metastasis in mice. *Neoplasia* 58, 538–547.

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

- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* *271*, 18188–18193.
- Dexter, D.L., Kowalski, H.M., Blazar, B.A., Fligiel, Z., Vogel, R., and Heppner, G.H. (1978). Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* *38*, 3174–3181.
- Dohmen, C., Fröhlich, T., Lächelt, U., Röhl, I., Vornlocher, H.-P., Hadwiger, P., and Wagner, E. (2012). Defined Folate-PEG-siRNA Conjugates for Receptor-specific Gene Silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *1*, e7.
- Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., and Saigo, K. (2003). Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr. Biol. CB* *13*, 41–46.
- Donzé, O., and Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* *30*, e46.
- Doody, A.M., Korley, J.N., Dang, K.P., Zawaneh, P.N., and Putnam, D. (2006). Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine for DNA delivery in vitro. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *116*, 227–237.
- Douat, C., Aisenbrey, C., Antunes, S., Decossas, M., Lambert, O., Bechinger, B., Kichler, A., and Guichard, G. (2015). A cell-penetrating foldamer with a bio reducible linkage for intracellular delivery of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *54*, 11133–11137.
- Dowler, T., Bergeron, D., Tedeschi, A.-L., Paquet, L., Ferrari, N., and Damha, M.J. (2006). Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Res.* *34*, 1669–1675.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* *4*.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* *15*, 188–200.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001b). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494–498.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* *20*, 6877–6888.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods San Diego Calif* *26*, 199–213.

Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822.

Ellis, V., Behrendt, N., and Danø, K. (1991). Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 12752–12758.

Elmén, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Ørum, H., Koch, T., et al. (2005). Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* 33, 439–447.

Ewe, A., Schaper, A., Barnert, S., Schubert, R., Temme, A., Bakowsky, U., and Aigner, A. (2014). Storage stability of optimal liposome–polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery. *Acta Biomater.* 10, 2663–2673.

Farhood, H., Gao, X., Son, K., Yang, Y.Y., Lazo, J.S., Huang, L., Barsoum, J., Bottega, R., and Epand, R.M. (1994). Cationic liposomes for direct gene transfer in therapy of cancer and other diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716, 23–34; discussion 34–35.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7413–7417.

Fillat, C., Carrió, M., Cascante, A., and Sangro, B. (2003). Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr. Gene Ther.* 3, 13–26.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.

Fischer, A. (2014). Gene therapy: Repair and replace. *Nature* 510, 226–227.

Forrest, M.L., Meister, G.E., Koerber, J.T., and Pack, D.W. (2004). Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery. *Pharm. Res.* 21, 365–371.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.

Gálvez, B.G., Matías-Román, S., Yáñez-Mó, M., Vicente-Manzanares, M., Sánchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2004). Caveolae Are a Novel Pathway for Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Traffic in Human Endothelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 678–687.

Gao, X., and Huang, L. (1996). Potentiation of Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery by Polycations. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 1027–1036.

Gao, S., Tian, H., Guo, Y., Li, Y., Guo, Z., Zhu, X., and Chen, X. (2015). miRNA oligonucleotide and sponge for miRNA-21 inhibition mediated by PEI-PLL in breast cancer therapy. *Acta Biomater.*

Garbuzenko, O.B., Saad, M., Betigeri, S., Zhang, M., Vetcher, A.A., Soldatenkov, V.A., Reimer, D.C., Pozharov, V.P., and Minko, T. (2009). Intratracheal versus intravenous liposomal

- delivery of siRNA, antisense oligonucleotides and anticancer drug. *Pharm. Res.* 26, 382–394.
- Garzon, R., Marcucci, G., and Croce, C.M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 775–789.
- Geall, A.J., Mandl, C.W., and Ulmer, J.B. (2013). RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin. Immunol.* 25, 152–159.
- Gelmon, K.A., Boyle, F.M., Kaufman, B., Huntsman, D.G., Manikhas, A., Di Leo, A., Martin, M., Schwartzberg, L.S., Lemieux, J., Aparicio, S., et al. (2015). Lapatinib or Trastuzumab Plus Taxane Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Advanced Breast Cancer: Final Results of NCIC CTG MA.31. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 1574–1583.
- Geretti, E., Leonard, S.C., Dumont, N., Lee, H., Zheng, J., De Souza, R., Gaddy, D.F., Espelin, C.W., Jaffray, D.A., Moyo, V., et al. (2015). Cyclophosphamide-mediated tumor priming for enhanced delivery and anti-tumor activity of HER2-targeted liposomal doxorubicin (MM-302). *Mol. Cancer Ther.*
- Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G. (2001). Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 22, 471–480.
- Goemans, N.M., Tulinius, M., van den Akker, J.T., Burm, B.E., Ekhardt, P.F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A.A., Platenburg, G.J., Sipkens, J.A., et al. (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 364, 1513–1522.
- Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1408, 79–89.
- Gomez, J.-P., Pichon, C., and Midoux, P. (2013). Ability of plasmid DNA complexed with histidinylated LPEI and LPEI to cross in vitro lung and muscle vascular endothelial barriers. *Gene* 525, 182–190.
- Gonçalves, C., Berchel, M., Gosselin, M.-P., Malard, V., Cheradame, H., Jaffrès, P.-A., Guégan, P., Pichon, C., and Midoux, P. (2014). Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection. *Int. J. Pharm.* 460, 264–272.
- Gonzalez, H., Hwang, S.J., and Davis, M.E. (1999). New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjug. Chem.* 10, 1068–1074.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., Dongen, S. van, and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36, D154–D158.
- Grismayer, B., Sato, S., Kopitz, C., Ries, C., Soelch, S., Schmitt, M., Baretton, G., Krüger, A., Luther, T., Kotzsch, M., et al. (2012). Overexpression of the urokinase receptor splice variant uPAR-del4/5 in breast cancer cells affects cell adhesion and invasion in a dose-dependent manner and modulates transcription of tumor-associated genes. *Biol. Chem.* 393, 1449–1455.

- Gustafsson, J., Arvidson, G., Karlsson, G., and Almgren, M. (1995). Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1235*, 305–312.
- Gutbier, B., Kube, S.M., Reppe, K., Santel, A., Lange, C., Kaufmann, J., Suttorp, N., and Witzernath, M. (2010). RNAi-mediated suppression of constitutive pulmonary gene expression by small interfering RNA in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *23*, 334–344.
- Hagerman, P.J. (1997). Flexibility of RNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *26*, 139–156.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* *404*, 293–296.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Vandenburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S.A., Weber, K., and Tuschl, T. (2003). Sequence, Chemical, and Structural Variation of Small Interfering RNAs and Short Hairpin RNAs and the Effect on Mammalian Gene Silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* *13*, 83–105.
- Hassani, Z., Lemkine, G.F., Erbacher, P., Palmier, K., Alfama, G., Giovannangeli, C., Behr, J.-P., and Demeneix, B.A. (2005). Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J. Gene Med.* *7*, 198–207.
- Heidel, J.D., Yu, Z., Liu, J.Y.-C., Rele, S.M., Liang, Y., Zeidan, R.K., Kornbrust, D.J., and Davis, M.E. (2007). Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 5715–5721.
- Henschel, A., Buchholz, F., and Habermann, B. (2004). DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Res.* *32*, W113–W120.
- Heppner, G.H., Dexter, D.L., DeNucci, T., Miller, F.R., and Calabresi, P. (1978). Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. *Cancer Res.* *38*, 3758–3763.
- Hoellenriegel, J., Zboralski, D., Maasch, C., Rosin, N.Y., Wierda, W.G., Keating, M.J., Kruschinski, A., and Burger, J.A. (2014). The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* *123*, 1032–1039.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E., and Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1757–1766.
- Hornung, V., Guenthner-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., et al. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* *11*, 263–270.
- Hoyer, J., and Neundorff, I. (2012). Peptide vectors for the nonviral delivery of nucleic acids. *Acc. Chem. Res.* *45*, 1048–1056.

- Hsieh, A.C., Bo, R., Manola, J., Vazquez, F., Bare, O., Khvorova, A., Scaringe, S., and Sellers, W.R. (2004). A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res.* *32*, 893–901.
- Huang, X., Schwind, S., Yu, B., Santhanam, R., Wang, H., Hoellerbauer, P., Mims, A., Klisovic, R., Walker, A.R., Chan, K.K., et al. (2013). Targeted Delivery of microRNA-29b by Transferrin Conjugated Anionic Lipopolyplex Nanoparticles: A Novel Therapeutic Strategy in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 2355–2367.
- Huh, M.S., Lee, S.-Y., Park, S., Lee, S., Chung, H., Lee, S., Choi, Y., Oh, Y.-K., Park, J.H., Jeong, S.Y., et al. (2010). Tumor-homing glycol chitosan/polyethylenimine nanoparticles for the systemic delivery of siRNA in tumor-bearing mice. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *144*, 134–143.
- Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E., and Triche, T.J. (2005). Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* *65*, 8984–8992.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.
- Ichihara, M., Murakumo, Y., Masuda, A., Matsuura, T., Asai, N., Jijiwa, M., Ishida, M., Shinmi, J., Yatsuya, H., Qiao, S., et al. (2007). Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res.* *35*, e123.
- Immordino, M.L., Dosio, F., and Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine* *1*, 297–315.
- Ishida, T., Harada, M., Wang, X.Y., Ichihara, M., Irimura, K., and Kiwada, H. (2005). Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *105*, 305–317.
- Jackson, A.L., and Linsley, P.S. (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 57–67.
- Jagani, H.V., Josyula, V.R., Palanimuthu, V.R., Hariharapura, R.C., and Gang, S.S. (2013). Improvement of therapeutic efficacy of PLGA nanoformulation of siRNA targeting anti-apoptotic Bcl-2 through chitosan coating. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *48*, 611–618.
- Janowski, B.A., Huffman, K.E., Schwartz, J.C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D.S., Minna, J.D., and Corey, D.R. (2006). Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 787–792.
- Jiang, G., Park, K., Kim, J., Kim, K.S., and Hahn, S.K. (2009). Target specific intracellular delivery of siRNA/PEI-HA complex by receptor mediated endocytosis. *Mol. Pharm.* *6*, 727–737.

- Jin, Y., Liu, S., Yu, B., Golan, S., Koh, C.-G., Yang, J., Huynh, L., Yang, X., Pang, J., Muthusamy, N., et al. (2010). Targeted Delivery of Antisense Oligodeoxynucleotide by Transferrin Conjugated pH-Sensitive Lipopolyplex Nanoparticles: A Novel Oligonucleotide -Based Therapeutic Strategy in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Pharm.* *7*, 196–206.
- Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* *23*, 457–462.
- Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C.H., and MacLachlan, I. (2006). Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo. *Mol. Ther.* *13*, 494–505.
- Judge, A.D., Robbins, M., Tavakoli, I., Levi, J., Hu, L., Fronda, A., Ambegia, E., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2009). Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 661–673.
- Kamaly, N., Kalber, T., Thanou, M., Bell, J.D., and Miller, A.D. (2009). Folate receptor targeted bimodal liposomes for tumor magnetic resonance imaging. *Bioconjug. Chem.* *20*, 648–655.
- Kane, M.A., Elwood, P.C., Portillo, R.M., Antony, A.C., Najfeld, V., Finley, A., Waxman, S., and Kolhouse, J.F. (1988). Influence on immunoreactive folate-binding proteins of extracellular folate concentration in cultured human cells. *J. Clin. Invest.* *81*, 1398–1406.
- Kawabata, K., Takakura, Y., and Hashida, M. (1995). The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm. Res.* *12*, 825–830.
- Keller, M., Harbottle, R.P., Perouzel, E., Colin, M., Shah, I., Rahim, A., Vaysse, L., Bergau, A., Moritz, S., Brahimi-Horn, C., et al. (2003). Nuclear localisation sequence templated nonviral gene delivery vectors: investigation of intracellular trafficking events of LMD and LD vector systems. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *4*, 286–298.
- Kelley, K.M.M., Rowan, B.G., and Ratnam, M. (2003). Modulation of the folate receptor alpha gene by the estrogen receptor: mechanism and implications in tumor targeting. *Cancer Res.* *63*, 2820–2828.
- Khan, A., Benboubetra, M., Sayyed, P.Z., Ng, K.W., Fox, S., Beck, G., Benter, I.F., and Akhtar, S. (2004). Sustained Polymeric Delivery of Gene Silencing Antisense ODNs, siRNA, DNazymes and Ribozymes: In Vitro and In Vivo Studies. *J. Drug Target.* *12*, 393–404.
- Kim, D.H., and Rossi, J.J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 173–184.
- Kim, C.-K., Choi, E.-J., Choi, S.-H., Park, J.-S., Haider, K.H., and Ahn, W.S. (2003a). Enhanced p53 gene transfer to human ovarian cancer cells using the cationic nonviral vector, DDC. *Gynecol. Oncol.* *90*, 265–272.
- Kim, S.H., Jeong, J.H., Lee, S.H., Kim, S.W., and Park, T.G. (2008). Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *129*, 107–116.

- Kim, T.H., Ihm, J.E., Choi, Y.J., Nah, J.W., and Cho, C.S. (2003b). Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 93, 389–402.
- Kirchheis, R., Ostermann, E., Wolschek, M.F., Lichtenberger, C., Magin-Lachmann, C., Wightman, L., Kurs, M., and Wagner, E. (2002). Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor- α induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity. *Cancer Gene Ther.* 9, 673–680.
- Kirpotin, D.B., Drummond, D.C., Shao, Y., Shalaby, M.R., Hong, K., Nielsen, U.B., Marks, J.D., Benz, C.C., and Park, J.W. (2006). Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models. *Cancer Res.* 66, 6732–6740.
- Kiss, K., Brozik, A., Kucsma, N., Toth, A., Gera, M., Berry, L., Vallentin, A., Vial, H., Vidal, M., and Szakacs, G. (2012). Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. *PLoS One* 7, e37378.
- Kobayashi, H., Watanabe, R., and Choyke, P.L. (2014). Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* 4, 81–89.
- Koh, C.G., Zhang, X., Liu, S., Golan, S., Yu, B., Yang, X., Guan, J., Jin, Y., Talmon, Y., Muthusamy, N., et al. (2010). Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotide lipopolyplex nanoparticles assembled by microfluidic hydrodynamic focusing. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 141, 62–69.
- Koshkin, A.A., Singh, S.K., Nielsen, P., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C.E., and Wengel, J. (1998). LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 54, 3607–3630.
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., and He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 1–10.
- Kousidou, O.C., Roussidis, A.E., Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2004). Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res.* 24, 4025–4030.
- Kowalski, P.S., Kuninty, P.R., Bijlsma, K.T., Stuart, M.C.A., Leus, N.G.J., Ruiters, M.H.J., Molema, G., and Kamps, J.A.A.M. (2015). SAINT-liposome-polycation particles, a new carrier for improved delivery of siRNAs to inflamed endothelial cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 89, 40–47.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature* 438, 685–689.
- Krystofiak, E.S., Matson, V.Z., Steeber, D.A., and Oliver, J.A. (2012). Elimination of Tumor Cells Using Folate Receptor Targeting by Antibody-Conjugated, Gold-Coated Magnetite Nanoparticles in a Murine Breast Cancer Model. *J. Nanomater.* 2012, e431012.

- Kulkarni, M., Ozgur, S., and Stoecklin, G. (2010). On track with P-bodies. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 242–251.
- Kwok, A., and Hart, S.L. (2011). Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *7*, 210–219.
- Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* *30*, 363–364.
- Lam, J.K.W., Chow, M.Y.T., Zhang, Y., and Leung, S.W.S. (2015). siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *4*, e252.
- Landen, C.N., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M.T., Lopez-Berestein, G., and Sood, A.K. (2005). Therapeutic EphA2 Gene Targeting In vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. *Cancer Res.* *65*, 6910–6918.
- Lee, R.J., and Huang, L. (1996). Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.* *271*, 8481–8487.
- Lee, D., Lockey, R., and Mohapatra, S. (2006). Folate receptor-mediated cancer cell specific gene delivery using folic acid-conjugated oligochitosans. *J. Nanosci. Nanotechnol.* *6*, 2860–2866.
- Leng, Q., Scaria, P., Zhu, J., Ambulos, N., Campbell, P., and Mixson, A.J. (2005). Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA. *J. Gene Med.* *7*, 977–986.
- Leng, Q., Scaria, P., Lu, P., Woodle, M.C., and Mixson, A.J. (2008). Systemic delivery of HK Raf-1 siRNA polyplexes inhibits MDA-MB-435 xenografts. *Cancer Gene Ther.* *15*, 485–495.
- Leng, Q., Chou, S.-T., Scaria, P.V., Woodle, M.C., and Mixson, A.J. (2012). Buffering Capacity and Size of siRNA Polyplexes Influence Cytokine Levels. *Mol. Ther.* *20*, 2282–2290.
- Leong, P.L., Andrews, G.A., Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N.A., Watkins, S.F., et al. (2003). Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4138–4143.
- Lesage, D., Metelev, V., Borisova, O., Dolinnaya, N., Oretskaya, T., Baran-Marszak, F., Taillandier, E., Raphael, M., and Fagard, R. (2003). Specific covalent binding of a NF-kappaB decoy hairpin oligonucleotide targeted to the p50 subunit and induction of apoptosis. *FEBS Lett.* *547*, 115–118.
- Levy, D.E., and Darnell, J.E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 651–662.
- Li, Q., Tang, Q., Zhang, P., Wang, Z., Zhao, T., Zhou, J., Li, H., Ding, Q., Li, W., Hu, F., et al. (2015). Human epidermal growth factor receptor-2 antibodies enhance the specificity and anticancer activity of light-sensitive doxorubicin-labeled liposomes. *Biomaterials* *57*, 1–11.
- Lin, A.J., Slack, N.L., Ahmad, A., George, C.X., Samuel, C.E., and Safinya, C.R. (2003). Three-dimensional imaging of lipid gene-carriers: membrane charge density controls universal

transfection behavior in lamellar cationic liposome-DNA complexes. *Biophys. J.* **84**, 3307–3316.

Lindner, L.H., Eichhorn, M.E., Eibl, H., Teichert, N., Schmitt-Sody, M., Issels, R.D., and Dellian, M. (2004). Novel Temperature-Sensitive Liposomes with Prolonged Circulation Time. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2168–2178.

Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 576–577.

Liu, C., Liu, X., Rocchi, P., Qu, F., Iovanna, J.L., and Peng, L. (2014). Arginine-terminated generation 4 PAMAM dendrimer as an effective nanovector for functional siRNA delivery in vitro and in vivo. *Bioconjug. Chem.* **25**, 521–532.

Liu, C.-M., Liu, D.-P., and Liang, C.-C. (2002a). Oligonucleotide-mediated gene repair at DNA level: the potential applications for gene therapy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **80**, 620–628.

Liu, D., Mori, A., and Huang, L. (1992). Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1104**, 95–101.

Liu, D., Aguirre Ghiso, J., Estrada, Y., and Ossowski, L. (2002b). EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell* **1**, 445–457.

Liu, Q., Zhou, H., Cui, J., Cao, Z., and Xu, Y. (2012). Reconsideration of in-silico siRNA design based on feature selection: a cross-platform data integration perspective. *PloS One* **7**, e37879.

Llinas, P., Le Du, M.H., Gårdsvoll, H., Danø, K., Ploug, M., Gilquin, B., Stura, E.A., and Ménez, A. (2005). Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J.* **24**, 1655–1663.

Low, P.S., and Antony, A.C. (2004). Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1055–1058.

Lu, Z.J., and Mathews, D.H. (2008). OligoWalk: an online siRNA design tool utilizing hybridization thermodynamics. *Nucleic Acids Res.* **36**, W104–W108.

Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2006). Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 59–66.

Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., and Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **114**, 100–109.

Ly, A., Duc, H.T., Kalamarides, M., Trojan, L.A., Pan, Y., Shevelev, A., François, J.-C., Noël, T., Kane, A., Henin, D., et al. (2001). Human glioma cells transformed by IGF-I triple helix technology show immune and apoptotic characteristics determining cell selection for gene therapy of glioblastoma. *Mol. Pathol.* **54**, 230–239.

Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Marcusson, E.G., Teruya-Feldstein, J., Bell, G.W., and Weinberg, R.A. (2010). Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat. Biotechnol.* 28, 341–347.

Maeda, H. (2010). Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs *via* the EPR Effect: Background and Future Prospects. *Bioconjug. Chem.* 21, 797–802.

Mann, M.J. (2005). Transcription Factor Decoys: A New Model for Disease Intervention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1058, 128–139.

Manzoor, A.A., Lindner, L.H., Landon, C.D., Park, J.-Y., Simnick, A.J., Dreher, M.R., Das, S., Hanna, G., Park, W., Chilkoti, A., et al. (2012). Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors. *Cancer Res.* 72, 5566–5575.

Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., Hall, N., Peters, W.H.M., Roelofs, R., Boleij, A., and Tjalsma, H. (2011). Towards the human colorectal cancer microbiome. *PloS One* 6, e20447.

Marshall, W.S., and Caruthers, M.H. (1993). Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug. *Science* 259, 1564–1570.

Maruyama, K. (2011). Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 161–169.

Maruyama, K., Yuda, T., Okamoto, A., Kojima, S., Suginaka, A., and Iwatsuru, M. (1992). Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 44–49.

Matherly, L.H., and Goldman, D.I. (2003). Membrane transport of folates. *Vitam. Horm.* 66, 403–456.

Mathias, C.J., Wang, S., Waters, D.J., Turek, J.J., Low, P.S., and Green, M.A. (1998). Indium-111-DTPA-folate as a potential folate-receptor-targeted radiopharmaceutical. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 39, 1579–1585.

Mathias, C.J., Hubers, D., Low, P.S., and Green, M.A. (2000). Synthesis of [(99m)Tc]DTPA-folate and its evaluation as a folate-receptor-targeted radiopharmaceutical. *Bioconjug. Chem.* 11, 253–257.

McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517–533.

Merkel, O.M., Beyerle, A., Librizzi, D., Pfestroff, A., Behr, T.M., Sproat, B., Barth, P.J., and Kissel, T. (2009). Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. *Mol. Pharm.* 6, 1246–1260.

Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P.D., and Flavell, R.B. (1997). RNA-Mediated RNA Degradation and Chalcone Synthase A Silencing in Petunia. *Cell* 88, 845–854.

Mével, M., Breuzard, G., Yaouanc, J.-J., Clément, J.-C., Lehn, P., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2008a). Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate

lipids: high efficiency of an imidazolium derivative. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **9**, 1462–1471.

Mével, M., Neveu, C., Gonçalves, C., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2008b). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 3124–3126.

Meyer, M., Philipp, A., Oskuee, R., Schmidt, C., and Wagner, E. (2008). Breathing life into polycations: functionalization with pH-responsive endosomolytic peptides and polyethylene glycol enables siRNA delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3272–3273.

Meyer, M., Dohmen, C., Philipp, A., Kiener, D., Maiwald, G., Scheu, C., Ogris, M., and Wagner, E. (2009). Synthesis and biological evaluation of a bioresponsive and endosomolytic siRNA-polymer conjugate. *Mol. Pharm.* **6**, 752–762.

Midoux, P., and Monsigny, M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem.* **10**, 406–411.

Midoux, P., Roche, A.C., and Monsigny, M. (1986). Estimation of the degradation of endocytosed material by flow cytofluorometry using two neoglycoproteins containing different numbers of fluorescein molecules. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* **58**, 221–225.

Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J.C., and Monsigny, M. (1998). Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug. Chem.* **9**, 260–267.

Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J.P., and Pichon, C. (2008). Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr. Gene Ther.* **8**, 335–352.

Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J., and Jaffrès, P.-A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 166–178.

Mishra, S., Heidel, J.D., Webster, P., and Davis, M.E. (2006). Imidazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery *via* multiple processes. *J. Controlled Release* **116**, 179–191.

Mockey, M., Gonçalves, C., Dupuy, F.P., Lemoine, F.M., Pichon, C., and Midoux, P. (2006). mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1062–1068.

Mockey, M., Bourseau, E., Chandrashekhar, V., Chaudhuri, A., Lafosse, S., Le Cam, E., Quesniaux, V.F.J., Ryffel, B., Pichon, C., and Midoux, P. (2007). mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther.* **14**, 802–814.

- Mongelard, F., and Bouvet, P. (2010). AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *12*, 107–114.
- Monsigny, M., Roche, A.C., and Midoux, P. (1984). Uptake of neoglycoproteins *via* membrane lectin(s) of L1210 cells evidenced by quantitative flow cytofluorometry and drug targeting. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *51*, 187–196.
- Morishita, R., Gibbons, G.H., Horiuchi, M., Ellison, K.E., Nakama, M., Zhang, L., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Dzaou, V.J. (1995). A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5855–5859.
- Morrissey, D.V., Lockridge, J.A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Machemer, L., Radka, S., Jadhav, V., et al. (2005). Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* *23*, 1002–1007.
- Morrow, P.K., Murthy, R.K., Ensor, J.D., Gordon, G.S., Margolin, K.A., Elias, A.D., Urba, W.J., Weng, D.E., Rugo, H.S., and Hortobagyi, G.N. (2012). An open-label, phase 2 trial of RPI.4610 (Angiozyme) in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer* *118*, 4098–4104.
- Moshiri, F., Callegari, E., D'Abundo, L., Corrà, F., Lupini, L., Sabbioni, S., and Negrini, M. (2014). Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge: toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* *7*, 43–54.
- Muratovska, A., and Eccles, M.R. (2004). Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* *558*, 63–68.
- Nagamitsu, A., Greish, K., and Maeda, H. (2009). Elevating Blood Pressure as a Strategy to Increase Tumor-targeted Delivery of Macromolecular Drug SMANCS: Cases of Advanced Solid Tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *39*, 756–766.
- Nair, J.K., Willoughby, J.L.S., Chan, A., Charisse, K., Alam, M.R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kel'in, A.V., Milstein, S., et al. (2014). Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 16958–16961.
- Naito, Y., Yoshimura, J., Morishita, S., and Ui-Tei, K. (2009). siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics* *10*, 392.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. *Plant Cell* *2*, 279–289.
- Nguyen, J., Steele, T.W.J., Merkel, O., Reul, R., and Kissel, T. (2008). Fast degrading polyesters as siRNA nano-carriers for pulmonary gene therapy. *J. Controlled Release* *132*, 243–251.

- Nishina, K., Unno, T., Uno, Y., Kubodera, T., Kanouchi, T., Mizusawa, H., and Yokota, T. (2008). Efficient In Vivo Delivery of siRNA to the Liver by Conjugation of α -Tocopherol. *Mol. Ther.* 16, 734–740.
- Noble, G.T., Stefanick, J.F., Ashley, J.D., Kiziltepe, T., and Bilgicer, B. (2014). Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol.* 32, 32–45.
- Normanno, N., Morabito, A., De Luca, A., Piccirillo, M.C., Gallo, M., Maiello, M.R., and Perrone, F. (2009). Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 675–702.
- O'Brien, S., Moore, J.O., Boyd, T.E., Larratt, L.M., Skotnicki, A., Koziner, B., Chanan-Khan, A.A., Seymour, J.F., Bociek, R.G., Pavletic, S., et al. (2007). Randomized Phase III Trial of Fludarabine Plus Cyclophosphamide With or Without Oblimersen Sodium (Bcl-2 antisense) in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 25, 1114–1120.
- Okamura, K., and Lai, E.C. (2008). Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 673–678.
- Oskuee, R.K., Philipp, A., Dehshahri, A., Wagner, E., and Ramezani, M. (2010). The impact of carboxyalkylation of branched polyethylenimine on effectiveness in small interfering RNA delivery. *J. Gene Med.* 12, 729–738.
- Patel, H.M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, 39–90.
- Pelisek, J., Gaedtke, L., DeRouchey, J., Walker, G.F., Nikol, S., and Wagner, E. (2006). Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under in vitro conditions. *J. Gene Med.* 8, 186–197.
- Penuel, E., Akita, R.W., and Sliwkowski, M.X. (2002). Identification of a region within the ErbB2/HER2 intracellular domain that is necessary for ligand-independent association. *J. Biol. Chem.* 277, 28468–28473.
- Perche, F., Benvegna, T., Berchel, M., Lebegue, L., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2011a). Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 445–453.
- Perche, F., Gosset, D., Mével, M., Miramon, M.-L., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., Benvegna, T., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2011b). Selective gene delivery in dendritic cells with mannosylated and histidylated lipopolyplexes. *J. Drug Target.* 19, 315–325.
- Pichon, C., Gonçalves, C., and Midoux, P. (2001). Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 75–94.
- Pichon, C., Billiet, L., and Midoux, P. (2010). Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 640–645.

- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 67–77.
- Prager, G.W., Breuss, J.M., Steurer, S., Olcaydu, D., Mihaly, J., Brunner, P.M., Stockinger, H., and Binder, B.R. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2-Induced Initial Endothelial Cell Migration Depends on the Presence of the Urokinase Receptor. *Circ. Res.* 94, 1562–1570.
- Prakash, T.P., Graham, M.J., Yu, J., Carty, R., Low, A., Chappell, A., Schmidt, K., Zhao, C., Aghajan, M., Murray, H.F., et al. (2014). Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* 42, 8796–8807.
- Pulaski, B.A., and Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan Al Chapter 20*, Unit 20.2.
- Qi, M., Liu, Z., Shen, C., Wang, L., Zeng, J., Wang, C., Li, C., Fu, W., Sun, Y., and Han, B. (2015). Overexpression of ETV4 is associated with poor prognosis in prostate cancer: involvement of uPA/uPAR and MMPs. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 3565–3572.
- Qin, L., Wang, C.-Z., Fan, H.-J., Zhang, C.-J., Zhang, H.-W., Lv, M.-H., and Cui, S.-D. (2014). A dual-targeting liposome conjugated with transferrin and arginine-glycine-aspartic acid peptide for glioma-targeting therapy. *Oncol. Lett.* 8, 2000–2006.
- Quanz, M., Berthault, N., Roulin, C., Roy, M., Herbette, A., Agrario, C., Alberti, C., Josserand, V., Coll, J.-L., Sastre-Garau, X., et al. (2009). Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 1308–1316.
- Rädler, J.O., Koltover, I., Salditt, T., and Safinya, C.R. (1997). Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 275, 810–814.
- Recondo, G.J., Diaz Canton, E., de la Vega, M., Greco, M., Recondo, G.S., and Valsecchi, M.E. (2014). Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions. *World J. Clin. Oncol.* 5, 440–454.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326–330.
- Reynolds, J.G., Geretti, E., Hendriks, B.S., Lee, H., Leonard, S.C., Klinz, S.G., Noble, C.O., Lückner, P.B., Zandstra, P.W., Drummond, D.C., et al. (2012). HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 1–10.
- Richards Grayson, A.C., Doody, A.M., and Putnam, D. (2006). Biophysical and Structural Characterization of Polyethylenimine-Mediated siRNA Delivery in Vitro. *Pharm. Res.* 23, 1868–1876.

Riviere, K., Huang, Z., Jerger, K., Macaraeg, N., and Szoka, F.C. (2011). Antitumor Effect of Folate-Targeted Liposomal Doxorubicin in KB Tumor-Bearing Mice after Intravenous Administration. *J. Drug Target.* *19*, 14–24.

Rodríguez-Gascón, A., del Pozo-Rodríguez, A., and Solinís, M.Á. (2014). Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* *9*, 1833–1843.

Rosenberg, J.E., Bambury, R.M., Van Allen, E.M., Drabkin, H.A., Lara, P.N., Harzstark, A.L., Wagle, N., Figlin, R.A., Smith, G.W., Garraway, L.A., et al. (2014). A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Invest. New Drugs* *32*, 178–187.

Rossi, J.J. (2005a). Mammalian Dicer finds a partner. *EMBO Rep.* *6*, 927–929.

Rossi, J.J. (2005b). RNAi and the P-body connection. *Nat. Cell Biol.* *7*, 643–644.

Rozema, D.B., Lewis, D.L., Wakefield, D.H., Wong, S.C., Klein, J.J., Roesch, P.L., Bertin, S.L., Reppen, T.W., Chu, Q., Blokhin, A.V., et al. (2007). Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12982–12987.

Rubin, I., and Yarden, Y. (2001). The basic biology of HER2. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *12 Suppl 1*, S3–S8.

Ryan, B.M., Robles, A.I., and Harris, C.C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 389–402.

Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., and Mo, Y.-Y. (2009). p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3207–3212.

Said Hassane, F., Frisch, B., and Schuber, F. (2006). Targeted Liposomes: Convenient Coupling of Ligands to Preformed Vesicles Using “Click Chemistry.” *Bioconjug. Chem.* *17*, 849–854.

Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17719–17724.

Samoylova, T.I., and Smith, B.F. (1999). Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening. *Muscle Nerve* *22*, 460–466.

Sanders, N., Rudolph, C., Braeckmans, K., De Smedt, S.C., and Demeester, J. (2009). Extracellular barriers in respiratory gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *61*, 115–127.

Scherphof, G.L., Dijkstra, J., Spanjer, H.H., Derksen, J.T., and Roerdink, F.H. (1985). Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat Kupffer cells in vivo and in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *446*, 368–384.

Sehgal, A., Barros, S., Ivanciu, L., Cooley, B., Qin, J., Racie, T., Hettinger, J., Carioto, M., Jiang, Y., Brodsky, J., et al. (2015). An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat. Med.* *21*, 492–497.

- Sen, M., Thomas, S.M., Kim, S., Yeh, J.I., Ferris, R.L., Johnson, J.T., Duvvuri, U., Lee, J., Sahu, N., Joyce, S., et al. (2012). First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer Discov.* 2, 694–705.
- Senzer, N., Nemunaitis, J., Nemunaitis, D., Bedell, C., Edelman, G., Barve, M., Nunan, R., Pirollo, K.F., Rait, A., and Chang, E.H. (2013). Phase I Study of a Systemically Delivered p53 Nanoparticle in Advanced Solid Tumors. *Mol. Ther.* 21, 1096–1103.
- Shabalina, S.A., Spiridonov, A.N., and Ogurtsov, A.Y. (2006). Computational models with thermodynamic and composition features improve siRNA design. *BMC Bioinformatics* 7, 65.
- Shirakawa, T., Terao, S., Hinata, N., Tanaka, K., Takenaka, A., Hara, I., Sugimura, K., Matsuo, M., Hamada, K., Fuji, K., et al. (2007). Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Hum. Gene Ther.* 18, 1225–1232.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465–476.
- Simões, S., Slepishkin, V., Gaspar, R., de Lima, M.C., and Düzgüneş, N. (1998). Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusogenic peptides. *Gene Ther.* 5, 955–964.
- Sloan, E.K., Pouliot, N., Stanley, K.L., Chia, J., Moseley, J.M., Hards, D.K., and Anderson, R.L. (2006). Tumor-specific expression of $\alpha\beta 3$ integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res.* 8, R20.
- Song, H., Wang, G., He, B., Li, L., Li, C., Lai, Y., Xu, X., and Gu, Z. (2012). Cationic lipid-coated PEI/DNA polyplexes with improved efficiency and reduced cytotoxicity for gene delivery into mesenchymal stem cells. *Int. J. Nanomedicine* 7, 4637–4648.
- Souissi, I., Najjar, I., Ah-Koon, L., Schischmanoff, P.O., Lesage, D., Le Coquil, S., Roger, C., Dusanter-Fourt, I., Varin-Blank, N., Cao, A., et al. (2011). A STAT3-decoy oligonucleotide induces cell death in a human colorectal carcinoma cell line by blocking nuclear transfer of STAT3 and STAT3-bound NF- κ B. *BMC Cell Biol.* 12, 14.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., et al. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173–178.
- Stephenson, M.L., and Zamecnik, P.C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 285–288.
- Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., and Rhoads, R.E. (2001). Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl(3′-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3′-deoxy)GpppG. *RNA N. Y. N* 7, 1486–1495.

- Sternberg, B., Sorgi, F.L., and Huang, L. (1994). New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze—fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* 356, 361–366.
- Swain, S.M., Baselga, J., Kim, S.-B., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., Ciruelos, E., Ferrero, J.-M., Schneeweiss, A., Heeson, S., et al. (2015). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 724–734.
- Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., et al. (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534–538.
- Tanganyika-de Winter, C.L., Heemskerk, H., Karnaoukh, T.G., van Putten, M., de Kimpe, S.J., van Deutekom, J., and Aartsma-Rus, A. (2012). Long-term Exon Skipping Studies With 2'-O-Methyl Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides in Dystrophic Mouse Models. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e44.
- Tannock, I.F., and Rotin, D. (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* 49, 4373–4384.
- Thomas, M., and Klivanov, A.M. (2002). Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14640–14645.
- Tian, W., Li, B., Zhang, X., Dang, W., Wang, X., Tang, H., Wang, L., Cao, H., and Chen, T. (2012). Suppression of tumor invasion and migration in breast cancer cells following delivery of siRNA against Stat3 with the antimicrobial peptide PR39. *Oncol. Rep.* 28, 1362–1368.
- Tijsterman, M., and Plasterk, R.H.A. (2004). Dicers at RISC: The Mechanism of RNAi. *Cell* 117, 1–3.
- Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., and Smith, P. (1985). A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 17, 117–132.
- Tomita, N., Tomita, T., Yuyama, K., Tougan, T., Tajima, T., Ogihara, T., and Morishita, R. (2003). Development of novel decoy oligonucleotides: advantages of circular dumb-bell decoy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5, 107–112.
- Torchilin, V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 145–160.
- Trojan, L.A., Kopinski, P., Mazurek, A., Chyczewski, L., Ly, A., Jarocki, P., Nikliński, J., Shevelev, A., Trzos, R., Pan, Y., et al. (2003). IGF-I triple helix gene therapy of rat and human gliomas. *Rocz. Akad. Med. W Białymst.* 1995 48, 18–27.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510.
- Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 32, 936–948.

- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., and Aigner, A. (2005). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther.* *12*, 461–466.
- Urbiola, K., García, L., Zalba, S., Garrido, M.J., and Tros de Ilarduya, C. (2013). Efficient serum-resistant lipopolyplexes targeted to the folate receptor. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *83*, 358–363.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., and Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* *20*, 515–524.
- Voges, J., Reszka, R., Gossmann, A., Dittmar, C., Richter, R., Garlip, G., Kracht, L., Coenen, H.H., Sturm, V., Wienhard, K., et al. (2003). Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Ann. Neurol.* *54*, 479–487.
- Volanakis, J.E., and Narkates, A.J. (1981). Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers and complement. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *126*, 1820–1825.
- Wan, J., Sazani, P., and Kole, R. (2009). Modification of HER2 pre-mRNA alternative splicing and its effects on breast cancer cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *124*, 772–777.
- Wang, J., Lu, X.-X., Chen, D.-Z., Li, S.-F., and Zhang, L.-S. (2004). Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* *10*, 400–403.
- Wang, M., Löwik, D.W.P.M., Miller, A.D., and Thanou, M. (2009). Targeting the urokinase plasminogen activator receptor with synthetic self-assembly nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* *20*, 32–40.
- Watanabe, T., and Lin, H. (2014). Posttranscriptional Regulation of Gene Expression by Piwi Proteins and piRNAs. *Mol. Cell* *56*, 18–27.
- Watanabe, K., Harada-Shiba, M., Suzuki, A., Gokuden, R., Kurihara, R., Sugao, Y., Mori, T., Katayama, Y., and Niidome, T. (2009). In vivo siRNA delivery with dendritic poly(L-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Mol. Biosyst.* *5*, 1306–1310.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., et al. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* *453*, 539–543.
- Waters, J.S., Webb, A., Cunningham, D., Clarke, P.A., Raynaud, F., di Stefano, F., and Cotter, F.E. (2000). Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *18*, 1812–1823.
- Webb, A., Cunningham, D., Cotter, F., Clarke, P.A., di Stefano, F., Ross, P., Corbo, M., and Dzierzanowska, Z. (1997). BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet Lond. Engl.* *349*, 1137–1141.

- Wei, C., Möller, C.C., Altintas, M.M., Li, J., Schwarz, K., Zacchigna, S., Xie, L., Henger, A., Schmid, H., Rastaldi, M.P., et al. (2008). Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat. Med.* *14*, 55–63.
- Weisman, S., Hirsch-Lerner, D., Barenholz, Y., and Talmon, Y. (2004). Nanostructure of Cationic Lipid-Oligonucleotide Complexes. *Biophys. J.* *87*, 609–614.
- Welser, K., Campbell, F., Kudsiova, L., Mohammadi, A., Dawson, N., Hart, S.L., Barlow, D.J., Hailes, H.C., Lawrence, M.J., and Tabor, A.B. (2013). Gene delivery using ternary lipopolyplexes incorporating branched cationic peptides: the role of Peptide sequence and branching. *Mol. Pharm.* *10*, 127–141.
- Wickstrom, E. (1998). *Clinical Trials of Genetic Therapy with Antisense DNA and DNA Vectors* (CRC Press).
- Widdicombe, J.G. (1997). Airway liquid: a barrier to drug diffusion? *Eur. Respir. J.* *10*, 2194–2197.
- Wilson, R.C., and Doudna, J.A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* *42*, 217–239.
- Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E.M., et al. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1149–1157.
- Woods, A.J., White, D.P., Caswell, P.T., and Norman, J.C. (2004). PKD1/PKC μ promotes $\alpha\beta$ 3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J.* *23*, 2531–2543.
- Wu, G.Y., and Wu, C.H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* *262*, 4429–4432.
- Wu, B., Xiao, B., Cloer, C., Shaban, M., Sali, A., Lu, P., Li, J., Nagaraju, K., Xiao, X., and Lu, Q.L. (2011). One-year treatment of morpholino antisense oligomer improves skeletal and cardiac muscle functions in dystrophic mdx mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 576–583.
- Xi, S., Gooding, W.E., and Grandis, J.R. (2005). In vivo antitumor efficacy of STAT3 blockade using a transcription factor decoy approach: implications for cancer therapy. *Oncogene* *24*, 970–979.
- Xu, C., and Wang, J. (2015). Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian J. Pharm. Sci.* *10*, 1–12.
- Xu, Y., and Szoka, F.C. (1996). Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 5616–5623.
- Xu, X., Hamhouyia, F., Thomas, S.D., Burke, T.J., Girvan, A.C., McGregor, W.G., Trent, J.O., Miller, D.M., and Bates, P.J. (2001). Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* *276*, 43221–43230.

- Yang, L., Peng, X.-H., Wang, Y.A., Wang, X., Cao, Z., Ni, C., Karna, P., Zhang, X., Wood, W.C., Gao, X., et al. (2009). Receptor-Targeted Nanoparticles for In vivo Imaging of Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* *15*, 4722–4732.
- Yang, L., Sajja, H.K., Cao, Z., Qian, W., Bender, L., Marcus, A.I., Lipowska, M., Wood, W.C., and Wang, Y.A. (2013). uPAR-targeted Optical Imaging Contrasts as Theranostic Agents for Tumor Margin Detection. *Theranostics* *4*, 106–118.
- Yang, T., Li, B., Qi, S., Liu, Y., Gai, Y., Ye, P., Yang, G., Zhang, W., Zhang, P., He, X., et al. (2014). Co-delivery of Doxorubicin and Bmi1 siRNA by Folate Receptor Targeted Liposomes Exhibits Enhanced Anti-Tumor Effects in vitro and in vivo. *Theranostics* *4*, 1096–1111.
- Yang, X., Cheng, Y., Li, P., Tao, J., Deng, X., Zhang, X., Gu, M., Lu, Q., and Yin, C. (2015). A lentiviral sponge for miRNA-21 diminishes aerobic glycolysis in bladder cancer T24 cells via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR axis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 383–391.
- Yarden, Y. (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* *61 Suppl 2*, 1–13.
- Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., and Anderson, D.G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 541–555.
- Yu, C.-Y., Yuan, Z., Cao, Z., Wang, B., Qiao, C., Li, J., and Xiao, X. (2009). A muscle-targeting peptide displayed on AAV2 improves muscle tropism upon systemic delivery. *Gene Ther.* *16*, 953–962.
- Yu, H., Kortylewski, M., and Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 41–51.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P., and Jain, R.K. (1995). Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* *55*, 3752–3756.
- Yuan, M., Qiu, Y., Zhang, L., Gao, H., and He, Q. (2015). Targeted delivery of transferrin and TAT co-modified liposomes encapsulating both paclitaxel and doxorubicin for melanoma. *Drug Deliv.* 1–13.
- Zaczek, A., Brandt, B., and Bielawski, K.P. (2005). The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol. Histopathol.* *20*, 1005–1015.
- Zalba, S., Contreras, A.M., Haeri, A., ten Hagen, T.L.M., Navarro, I., Koning, G., and Garrido, M.J. (2015). Cetuximab-oxaliplatin-liposomes for epidermal growth factor receptor targeted chemotherapy of colorectal cancer. *J. Controlled Release* *210*, 26–38.
- Zamecnik, P.C., and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 280–284.

- Zamora-Avila, D.E., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M.A., Saavedra-Alonso, S., Trejo-Avila, L.M., Reséndez-Pérez, D., Méndez-Vázquez, J.L., Isaias-Badillo, J., and Rodríguez-Padilla, C. (2009). WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther.* 16, 892–899.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33.
- Zelphati, O., and Szoka, F.C. (1996a). Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.* 13, 1367–1372.
- Zelphati, O., and Szoka, F.C. (1996b). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11493–11498.
- Zhang, G., Zhang, Q.-Y., Miao, X.-P., Lin, D.-X., and Lu, Y.-Y. (2005). Polymorphisms and mutations of the folate receptor-alpha gene and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int. J. Mol. Med.* 15, 627–632.
- Zhang, X., Zhang, J., Wang, L., Wei, H., and Tian, Z. (2007). Therapeutic effects of STAT3 decoy oligodeoxynucleotide on human lung cancer in xenograft mice. *BMC Cancer* 7, 149.
- Zhang, X., Liu, P., Zhang, B., Wang, A., and Yang, M. (2010). Role of STAT3 decoy oligodeoxynucleotides on cell invasion and chemosensitivity in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 197, 46–53.
- Zhou, X., and Huang, L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1189, 195–203.
- Zhou, Y., Lü, X., Li, S., and Zhan, L. (2014). Correlation between the overexpression of urokinase receptor isoform uPAR (D1D2) and hepatic cell malignant transformation. *Mol. Med. Rep.* 9, 1689–1696.
- Zhu, H., Liang, Z.Y., Ren, X.Y., and Liu, T.H. (2006). Small interfering RNAs targeting mutant K-ras inhibit human pancreatic carcinoma cells growth in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1693–1698.
- Zhu, L., Kate, P., and Torchilin, V.P. (2012). Matrix Metalloprotease 2-Responsive Multifunctional Liposomal Nanocarrier for Enhanced Tumor Targeting. *ACS Nano* 6, 3491–3498.
- Ziello, J.E., Huang, Y., and Jovin, I.S. (2010). Cellular endocytosis and gene delivery. *Mol. Med. Camb. Mass* 16, 222–229.
- Zimmermann, T., Karsten, V., Harrop, J., Chan, A., Chiesa, J., Peters, G., Falzone, R., Cehelsky, J., Nochur, S., Vaishnaw, A., et al. (2013). Phase I First-in-Humans Trial of ALN-TTRsc, a Novel RNA Interference Therapeutic for the Treatment of Familial Amyloidotic Cardiomyopathy (FAC). *J. Card. Fail.* 19, S66–S66.

Zimmermann, T.S., Lee, A.C.H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M.N., Harborth, J., Heyes, J.A., Jeffs, L.B., John, M., et al. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* *441*, 111–114.

Zuckerman, J.E., Gritli, I., Tolcher, A., Heidel, J.D., Lim, D., Morgan, R., Chmielowski, B., Ribas, A., Davis, M.E., and Yen, Y. (2014). Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 11449–11454.

Zuhorn, I.S., Bakowsky, U., Polushkin, E., Visser, W.H., Stuart, M.C.A., Engberts, J.B.F.N., and Hoekstra, D. (2005). Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *11*, 801–810.

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

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



Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection

Cristine Gonçalves^a, Mathieu Berchel^b, Marie-Pierre Gosselin^a, Virginie Malard^a,
Hervé Cheradame^c, Paul-Alain Jaffrès^b, Philippe Guégan^d,
Chantal Pichon^a, Patrick Midoux^{a,*}

^a Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Inserm et Université d'Orléans, 45071 Orléans cedex 02, France

^b CEMCA, CNRS UMR 6521, SFR148 ScInBioS, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Brest, France

^c Polytheragene, Genopole Evry and Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, CNRS UMR8587 Université d'Evry Val d'Essonne, Evry, France

^d Laboratoire de Chimie des Polymères, UPMC UMR 7610, 94200 Ivry sur Seine, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2013

Accepted 1 November 2013

Available online xxx

Keywords:

RNA
RNA interference
Transfection
Histidine
Liposomes
Polymer

ABSTRACT

Lipopolyplexes formulations resulting from association of nucleic acid, cationic liposomes and a cationic polymer are attracting formulations for siRNA delivery. Herein, imidazole- and imidazolium-based liposomes in association with histidinylated polymers are studied to produce siRNA lipopolyplexes (LPRI) subsequently used for gene silencing. Several kinds of imidazole/histidine liposomes and cationic polymers are tested. The gene silencing effect is evaluated with synthetic siRNA directed against EGFP or luciferase mRNA, in HeLa cells stably expressing EGFP or B16F10 melanoma cells stably expressing luciferase, respectively. siRNA formulations are compared with those prepared using some commercial transfection reagents. One formulation called His-IPEI LPRI100 comprising siRNA, histidinylated IPEI (His-IPEI) and liposomes 100 made with *O,O*-dioleoyl-*N*-[3*N*-(*N*-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate and *O,O*-dioleoyl-*N*-histamine phosphoramidate appears to give the best specific inhibition of gene expression at 10 nM siRNA in a dose-dependent manner with low cytotoxicity. This formulation exhibits a size and a zeta potential of 60 nm and +84 mV, respectively. According to our previous works, histidinylated lipopolyplexes appears as a versatile formulation for DNA, mRNA and siRNA transfection.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Small interfering RNA (siRNA) are RNA duplexes consisting of two 21 mer oligonucleotides annealed together that inhibit protein synthesis by degrading or blocking the transcription of the

corresponding mRNA (Dehshahri et al., 2009). Thereby, they generate great hope for targeted therapies of a wide variety of diseases (Blake et al., 2012; Burnett and Rossi, 2012; Strumberg et al., 2012; Taberero et al., 2013; Wallace et al., 2012). Basically, the 5' sense strand – passenger strand – is degraded after siRNA binding to argonaute while the 3' antisense strand – incorporated into the RISC complex is guided on mRNA containing the guide strand complementary sequence. mRNA is then degraded or transcription blocked leading to inhibition of the corresponding protein. Synthetic siRNA exhibit nanomolar efficacies ranged from 100 nM with 21-bp siRNA with 3' overhanging dTdT dinucleotides to 5 nM with locked nucleic acids (LNA) modified 21-bp siRNA. But despite their considerable therapeutic interest, clinical results were delayed due to the absence of very efficient and safe delivery systems. A large variety of synthetic siRNA derivatives were proposed to increase their delivery efficiency (Aliabadi et al., 2012; Bruno, 2011; Daka and Peer, 2012; Guo et al., 2010; Singha et al., 2011). The 3' end of the sense strand has been coupled to various molecules such

Abbreviations: DOTAP, *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methyl sulfate; DSPE-PEG2000, polyethyleneglycol (M.W. 2000) – distearoylphosphatidylethanolamine; DSPE-PEG2000-NH₂, *N*-polyethyleneglycol (M.W. 2000) – distearoylphosphatidylethanolamine; DC-Chol, [*N*-(*N*,*N*'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol hydrochloride; DOTMA, *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride; DOC-SPER, [1,3-dioleoyloxy-2-(*N*(5)-carbamoyl-spermine)-propane]; DSAA, *N,N*-distearyl-*N*-methyl-*N*-2-(*N*'-arginyl)aminoethyl ammonium chloride; DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-Phosphoethanolamine; DPPG, 1-phosphatidyl-glycerol; DPPC, dipalmitoyl-phosphatidyl-choline; PC, phosphatidyl-choline.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 38 25 55 65.

E-mail address: Patrick.midoux@cnrs-orleans.fr (P. Midoux).

as cholesterol, CPP and RGD peptides, folic acid, sugars, aptamers, oligonucleotides, immunoglobulins and polymers. Synthetic siRNA were also encapsulated in neutral liposomes and formulated either as lipoplexes and polyplexes after electrostatic interaction with positively charged liposomes and polymers, respectively. Liposomes were sometimes linked to a cell recognition molecule for specific delivery purpose (Akinc et al., 2010). Currently, clinical trials are conducted with polyplexes made with cyclodextrin-based cationic polymer (CALAA-01) and with lipoplexes (AtuPLEX and SNALP) (Haussecker, 2012). Ternary complexes (lipopolyplexes) between cationic liposomes, a cationic polymer or peptide and synthetic siRNA are also proposed. Lipopolyplexes were made with protamine sulfate and DOTAP/cholesterol liposomes. Insertion of DSPE-PEG2000 or DSPE-PEG2000-NH₂ into preformed DOTAP/cholesterol liposomes was performed to produce stealth liposome formulation and/or to introduce a cell recognition signal (Chen et al., 2009; Chono et al., 2008; Gao et al., 2012; Li et al., 2008; Li and Huang, 2006; Vader et al., 2012; Zhang et al., 2012). We have developed lipopolyplexes for DNA and mRNA transfection made with liposomes (Lip100) comprising an *N*-methylimidazolium lipophosphoramidate and a histamine lipophosphoramidate, and PEGylated histidylated polylysine (PEG-HpK) as cationic polymer (Perche et al., 2011a,b, 2012; Pichon and Midoux, 2013). The *N*-methylimidazolium lipophosphoramidate exhibits a permanent positive charge used to interact with nucleic acids whilst the imidazole moiety of the histamine lipophosphoramidate and histidylated polylysine acquires a cationic charge when the pH of the medium drops below pH 6. Hence, these protonable groups can induce an acid-mediated membrane destabilization of endosomes by increasing the fusogenic properties between the cationic imidazole-based lipid and endosomal membrane (Midoux et al., 2009) and/or a proton sponge effect (Boussif et al., 1995; Sonawane et al., 2003) favoring nucleic acids delivery in the cytosol.

In this work we have evaluated the efficiency of this type of formulation to transfer synthetic siRNA. Several kinds of liposomes and cationic polymers were tested to prepare liposome (L), polymer (P) and siRNA (Ri) ternary complexes so called LPRI. The gene silencing effect was evaluated with siRNA directed against EGFP or luciferase mRNA, in HeLa cells stably expressing EGFP or B16F10 melanoma cells stably expressing luciferase, respectively. Efficiency of our LPRI was compared with that of some commercial transfection reagents.

2. Material and methods

All reagents were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) unless otherwise stated. Tosylate salts of Poly-L-lysine (pLK; average Mw = 58 kDa) and of PEGylated histidylated poly-L-lysine (pLK substituted with 45% histidine residues and one mPEG molecule of 5 kDa, PEG-HpK; average Mw = 75.4 kDa) were prepared as described (Midoux and Monsigny, 1999; Mockey et al., 2007). Linear polyethylenimine (IPEI; Mw = 22 kDa) and IPEI grafted with 16% histidine residues (His-IPEI; Mw = 34.5 kDa) were synthesized as described (Bertrand et al., 2011). His-IPEI was produced by Polytheragene (Genepole, Evry, France). At pH 7.4, we estimated that pLK, PEG-HpK, IPEI and His-IPEI exhibited 190, 190, 102 and 85 cationic charges per polymer molecules, respectively. *O,O*-dioleoyl-*N*-[3*N*-(*N*-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate (KLN25; Mw = 787 Da), *O,O*-dimyristyl-*N*-[3*N*-(*N*-methylimidazolium iodide)propylene] phosphoramidate (KLN27; Mw = 679 Da), *O,O*-dioleoyl-*N*-histamine phosphoramidate (MM27; Mw = 692 Da) and *O,O*-dimyristyl-*N*-histamine phosphoramidate (MM30; Mw = 584 Da) were synthesized as described (Mevel et al., 2008a,b). LipofectamineTM 2000 (LFM) was purchased from Invitrogen; JetPRIMETM and INTERFERinTM

from PolyplusTransfection. *N*-[1(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methyl sulfate (DOTAP; Mw = 774 Da) was from Sigma.

2.1. Liposomes

KLN25:MM27 (Lip100) were prepared by mixing 0.5 mL of 5.4 mM KLN25 in ethanol with 0.5 mL of 5.4 mM MM27 in ethanol. KLN27:MM30 were prepared by mixing 0.5 mL of 5.4 mM KLN27 in ethanol with 0.5 mL of 5.4 mM MM30 in ethanol. For KLN25, KLN27 and DOTAP, 1 mL of a selected compound at 5.4 mM in ethanol was pipetted in a test tube. Then, ethanol solutions were evaporated until formation of a film. The films were hydrated for 12 h at 4 °C in 0.5 mL of 10 mM Hepes buffer, pH 7.4 (HEPES), vortexed and then the suspensions were sonicated for 15 min at 37 kHz using a Bioblock ultrasonic bath (Bioblock Scientific, Illkirch, France). Liposomes (500 µL) were dialysed (Dialysis tubing cellulose membrane; MWCO: 12.4 kDa) at 4 °C for 6 h and overnight against 500 mL HEPES.

2.2. siRNA

siRNA directed against GFP and its negative control was purchased from Ambion Applied Biosystems (ref: AM4626). siRNA (Mw = 13,200 Da) directed against luciferase (LucGL3 siRNA; sense sequence: CUU ACG CUG AGU ACU UCG Adtdt and antisense sequence: UCG AAG UAC UCA GCG UAA Gtdtdt) and its Negative Control were from Ambion.

2.3. Cells and cell cultures

HeLa cells (CCL2, ATCC, Rockville MD, USA) stably expressing EGFP (HeLa-EGFP) or tubulin-EGFP (HeLa-Tub-EGFP) were obtained by transfection of HeLa cells with a homemade plasmid DNA encoding either EGFP or EGFP fused with α -tubulin under the control of the CMV promoter. After G418 (400 µg/mL) selection, clones expressing EGFP were selected by flow cytometry and subcloned with a cell sorter. These cells lines were maintained by regular passage in MEM (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 100 U/mL penicillin and 50 U/mL streptomycin each (Gibco) in the presence of G418 (100 µg/mL). B16F10 cells stably expressing luciferase (B16F10-Luc) (kindly given by Dr A. Jokowicz, Jagiellonian University, Krakow, Poland) were maintained by regular passages in DMEM (Invitrogen) containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin (all from Life Technologies). Cells were mycoplasma-free as evidenced by MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Levallois Perret, France).

2.4. siRNA formulations

siRNA lipoplexes (LRI) (500 µL at 50 nM siRNA) were prepared as followed. 5 µL (0.33 µg) of 5 µM siRNA were diluted in 4.5 µL HEPES and then added and mixed by 3 gentle pipetting to liposomes: 4.2 µL of 0.54 mM Lip 100, KLN25, KLN27 or KLN27/MM30 in 195.8 µL HEPES. For siRNA/DOTAP, 5 µL of 5 µM siRNA were mixed with 12.6 µL of 0.54 mM DOTAP in 187.4 µL HEPES according to Roche Applied Science. After 30 min at room temperature, the solution was completed to 500 µL with serum-free medium. For LRI with Lip100, KLN25, KLN27 and KLN27/MM30, lipid/siRNA molar ratios were 85.5; it was 257 for DOTAP. The corresponding positive/negative (N/P) charge ratios were ~1/1, ~2/1, ~2/1, ~1/1 and 6.5/1. siRNA polyplexes (PRi) (500 µL at 50 nM siRNA) were prepared as followed. pLK, IPEI, His-IPEI or PEG-HpK (10.5 µL

at 0.1 mg/ml in HEPES) was diluted in 10.5 μ L HEPES and then added and mixed with siRNA (5 μ L; 0.35 μ g of 5 μ M siRNA diluted in 4.5 μ L HEPES). After 10 s vortex, the solution was kept 30 min at room temperature before completed with 500 μ L serum-free medium. The polymer/siRNA molar and (N/P) ratios of PRi with pLK, IPEI, His-IPEI and PEG-HpK were 1.5 (3.2), 0.55 (4.6), 0.87 (2.4) and 1.9 (2.5), respectively. siRNA lipopolyplexes (LPri) (500 μ L at 50 nM siRNA) were prepared as followed. His-IPEI or PEG-HpK (10.5 μ L at 0.1 mg/ml in HEPES) was diluted in 10.5 μ L HEPES and then added to siRNA (5 μ L; 0.35 μ g of 5 μ M siRNA diluted in 4.5 μ L HEPES). After 10 s vortex, the solution was kept 30 min at room temperature. Then liposomes (4.2 μ L of 0.54 mM liposomes in 195.8 μ L HEPES) were added and mixed by 3 gentle pipetting. After 15 min at room temperature, the solution was completed to 500 μ L with serum-free medium. N/P were 3.5, 4.3, 3.6, 5.7, 4.6, 4.6, 3.5 and 8.8 for His-IPEI LPri100, pLK LPri100, PEG-HpK LPri100, IPEI LPri100, His-IPEI/KLN25, His-IPEI/KLN27, His-IPEI/KLN27/MM30 and His-IPEI/DOTAP, respectively.

2.5. Size and zeta potential measurements

Size and ζ potential of siRNA complexes were measured in HEPES by Quasi-elastic laser light scattering and electrophoretic mobility with the Nano ZS90 ZetaSizer (Malvern Instruments, Orsay, France), respectively. Measurements were calibrated with 204 nm latex nanosphere size standards and DTS 1050 standard.

2.6. Transfection

Two days before transfection, the cells were seeded in 24-well culture plates (1×10^5 cells/cm²). At the time of transfection, cells were 80% confluent. The medium was removed; cells were washed with serum-free medium and incubated at 37 °C with 0.5 mL of siRNA complexes solutions at the indicated concentration. After 24 h, the medium was removed and cells were cultured for 24 h in complete culture medium (with 10% FBS) without any transfection reagents. HeLa-EGFP cells were harvested with trypsin, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and the cell-associated EGFP fluorescence intensity was measured with a flow cytometer (FACSsort; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) with λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 530 $\pm$ 30 nm. The fluorescence intensity was expressed as the mean fluorescence intensity of 10,000 events. Luciferase expression in B16F10-Luc cells was quantified using the Promega luciferase assay system (Promega, E1500). Luciferase activity was measured using a luminometer (LUMAT LB 9507), normalized to total cell protein using a BCA protein assay kit (Uptima, Interchim SA, Montluçon, France) and expressed as relative light units (RLU) per mg protein. Data are the mean standard deviation of two experiments, each in triplicate.

2.7. qPCR

HeLa-EGFP cells were transfected with anti-EGFP siRNA complexes as described above. After 48 h, total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (Total RNA Isolation, Macherey-Nagel). Total RNA (400 ng) was reverse-transcribed to cDNA using 8 μ L of master mix solution (master mix solution without RNA for a single reaction: 4 μ L 5 $\times$ reaction buffer, 1 μ L Robolock RNase inhibitor (20 U/ μ L), 2 μ L at 10 mM dNTP Mix, 1 μ L Revert Aid M-MuLV reverse transcriptase 200 U/ μ L) (Fermentas Life Technologies) and DEPC-treated water to 20 μ L. The reaction was incubated at 42 °C for 60 min and then for 5 min at 70 °C. Total cDNA yield were measured at the Nanodrop. For real time quantitative PCR, PCR products were generated from 50 ng of cDNA template (used in triplicate) with QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, ref: 204054) and specific EGFP primers (sense: 5' ACGTAAACGGCCACAAGTTC

Table 1

EGFP Inhibition with anti-EGFP siRNA lipoplexes or lipopolyplexes.

EGFP inhibition (% of control)				
Liposomes	KLN25	KLN25:MM27	KLN27	KLN27:MM30
LRi	45	54	0	28
LPri	57	75	18	54

HeLa-EGFP cells were transfected for 24 h in the presence of 50 nM anti-EGFP siRNA complexed either with different cationic liposomes alone (LRi) or combined with His-IPEI polymer (LPri). Then, the cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. The cell fluorescence intensity was measured by flow cytometry and expressed as the percentage of fluorescence intensity of treated cells to non-treated cells (% of control).

3'; anti-sense: 5' AAGTCGTGCTGCTTCATGTG 3'). The specificity of the PCR amplicon (size and product) and absence of primer-dimer were verified by melt-curve analysis using BioRad CFX manager software (Biorad). PCR conditions were as follows: 1 cycle of 50 °C for 2 min and 1 cycle of 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, with a final melt curve analysis step (heating the PCR mixture from 60 °C to 95 °C by 0.5 °C every 5 s). All samples were normalized against the 18S rRNA level, for quantification of mRNA transcript (QuantumRNA Universal 18S Internal Standard, ref AM1718). Relative expression values were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equation and when indicated expressed as fold change relative to the control sample.

3. Results

3.1. siRNA polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes

To set up our readout, we first evaluated the capacity of anti-EGFP siRNA directed against EGFP mRNA to inhibit EGFP expression in HeLa cells stably expressing EGFP. For this purpose, siRNA was formulated with DOTAP. Fig. 1A shows that a specific inhibition of EGFP was obtained upon 48 h transfection. The inhibition was dose dependent and reached 55% at 50 nM anti-EGFP siRNA. The effect was sequence specific because the inhibition was less than 5% when the cells were transfected with 50 nM of scramble siRNA. We next evaluated this formulation to inhibit EGFP fused with tubulin in HeLa cells stably expressing tubulin-EGFP. A specific reduction of the EGFP fluorescence was observed in HeLa-Tub-EGFP cells upon transfection with 50 nM anti-EGFP siRNA with DOTAP (Fig. 1B). Then, we compared the efficiency of lipoplexes (LRi) made with different cationic liposomes comprising lipids bearing a histidine/imidazole polar head, and lipopolyplexes (LPri) made with those cationic liposomes and His-IPEI (Scheme 1). Liposomes were either KLN25 alone or KLN25:MM27 comprising KLN25 and the pH sensitive fusogenic lipophosphoramidate MM27. We also tested KLN27 liposomes and KLN27:MM30 liposomes comprising lipids with myristyl (C14:0) instead of oleyl (cis Δ 9 C18:1) chains. Polyplexes (PRi) were formed by mixing siRNA with His-IPEI at N/P of 2.4 and then LPri were formed by adding the above-mentioned cationic liposomes. Table 1 summarizes the inhibition efficiency obtained at 50 nM anti-EGFP siRNA. First, it appears that LRi containing lipophosphoramides with myristyl chains were not (KLN27) or less (KLN27:MM30) efficient than those made with KLN25 or KLN25:MM27 containing oleyl chains. LRi efficiency with KLN25:MM27 (54%) was close to that obtained with DOTAP (Fig. 1). All LPri were more efficient than LRi and the highest inhibition (75%) was obtained with KLN25:MM27 (so called His-IPEI/LPri100) at N/P 3.4. Compared to LRi and LPri with KLN25 or KLN27, the presence of the pH sensitive lipid (MM27 or MM30) in liposomes increased efficacy by providing enhanced endosome membrane destabilization upon the imidazole group protonation. In contrast

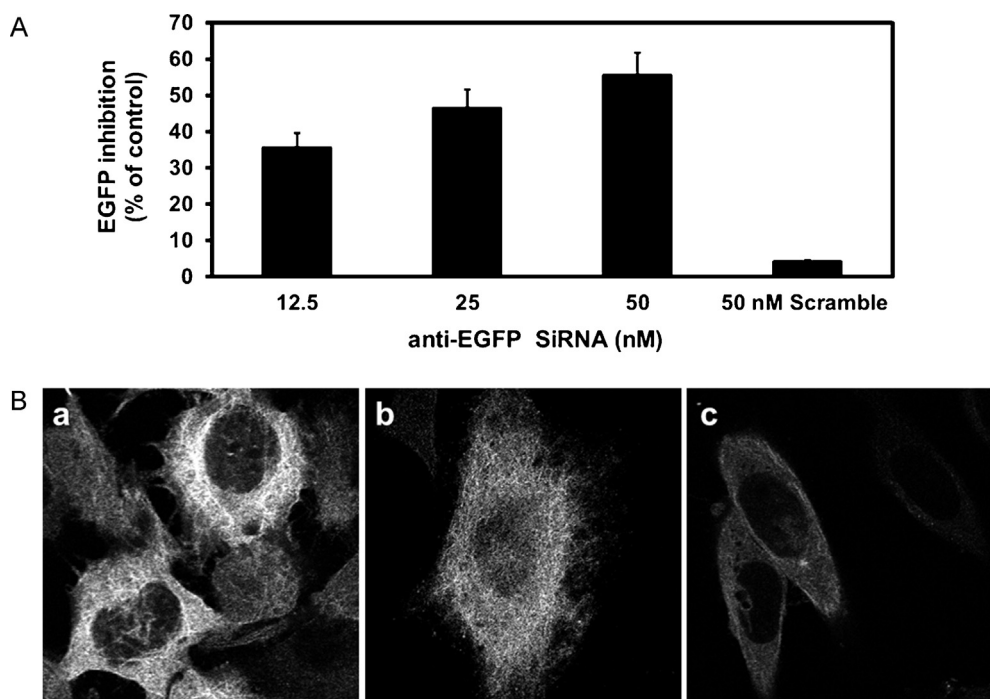
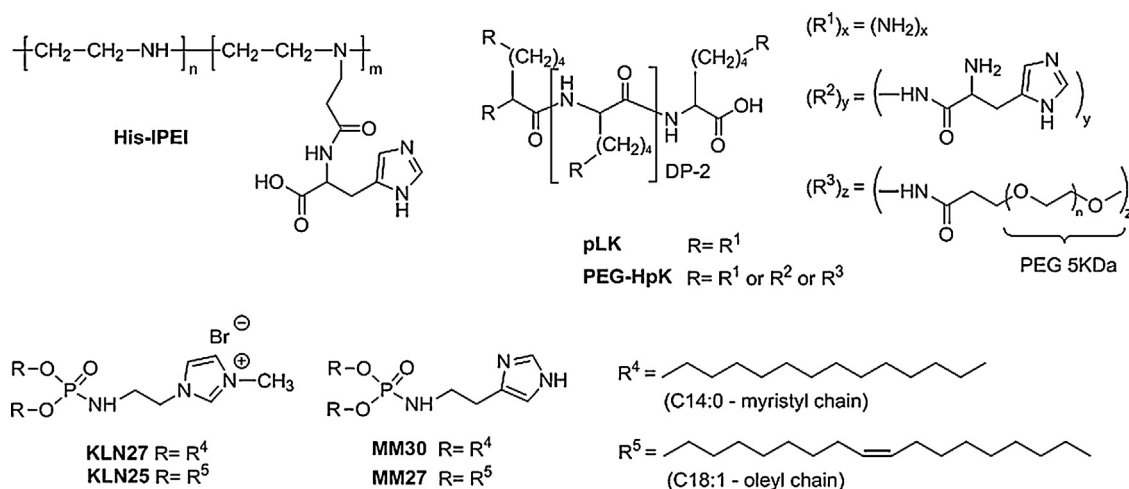


Fig. 1. Inhibition efficiency of anti-EGFP siRNA/DOTAP lipoplexes. (A) HeLa-EGFP cells were transfected for 24 h in the presence of siRNA/DOTAP at various anti-EGFP siRNA concentrations or at 50 nM scramble siRNA. The cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. The cell fluorescence intensity was then measured by flow cytometry and expressed as the percentage of fluorescence intensity of treated cells to untreated cells (% of control). (B) Confocal microscopy of HeLa-Tub-EGFP cells: (a) non transfected cells; transfected cells with 50 nM (b) scramble siRNA/DOTAP or (c) anti-EGFP siRNA/DOTAP.



Scheme 1. Structures of polymers and lipids.

to LRi and LPRI, His-IPEI PRI did not induce any EGFP inhibition whatever the polymer/siRNA ratio (Fig. 2). His-IPEI PRI (142 nm) and KLN25:MM27 LRi (126 nm) exhibited a bigger size than His-IPEI LPRI100 (60 nm) (Table 2). These siRNA complexes were positively charged and the ζ potential varied from +13 mV for PRI to +58 mV for LRi and +84 mV for LPRI.

Table 2

Size and ζ potential of siRNA polyplexes, siRNA lipoplexes and siRNA lipopolyplexes.

siRNA complexes	His-IPEI PRI	Lip100 LRi	His-IPEI LPRI100
Size (nm)	142 ± 9	126 ± 4	57 ± 4
ζ potential (mV)	13 ± 5	59 ± 10	84 ± 4

3.2. Comparative efficiency of LPRI100 to commercial vectors

Next, the efficiency of His-IPEI/LPRI100 was compared with siRNA complexed with JetPRIME™, INTERFERin® or Lipofectamine™2000 (LFM). We also compared the efficiency of PEG-HpK/LPRI100 where PEG-HpK was the polymer that we previously used to form lipopolyplexes with plasmid DNA and mRNA (Mockey et al., 2007; Perche et al., 2011a,b). HeLa-EGFP cells were transfected with 50 nM siRNA for 24 h and EGFP inhibition was measured over 72 h. EGFP expression dropped with time and the highest inhibition (70–80%) was observed after 72 h with all formulations except with INTERFERin® (Fig. 3). However, inhibitions observed after 48 h with histidinylated vectors – His-IPEI/LPRI100, PEG-HpK/LPRI100 and Lip100 (KLN25:MM27) – were already as high as that observed upon 72 h and dramatically

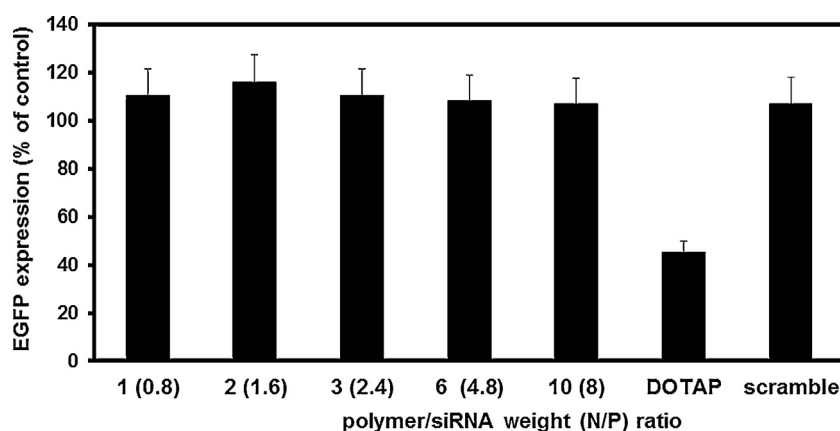


Fig. 2. Inhibition efficiency of siRNA directed against EGFP mRNA complexed with His-IPEI. HeLa-EGFP cells were transfected for 24 h in the presence of 50 nM anti-EGFP siRNA polyplexes at various siRNA/polymer weight ratios. As controls, the cells were transfected either with 50 nM anti-EGFP siRNA/DOTAP or 50 nM scramble siRNA/DOTAP. The cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. The cell fluorescence intensity was then measured by flow cytometry and expressed as the percentage of fluorescence intensity of treated cells to untreated cells (% of control).

higher than with JetPRIME™, INTERFERin® and LFM which were lower than 50% (Fig. 3).

3.3. Cytotoxicity of formulations

When compared, the cytotoxicity induced by each formulation showed that siRNA/JetPRIME™ and His-IPEI/LPRi100 were the less cytotoxic whilst it was the highest with LFM and Lip100 (Fig. 4). PEG-HpK/LPRi100 and INTERFERin® were slightly more toxic than His-IPEI/LPRi100. These results indicated that His-IPEI/LPRi100 was an effective formulation for siRNA transfection, which induced low cytotoxicity.

3.4. EGFP inhibition at mRNA level

The EGFP inhibition was also measured at the mRNA level by using qPCR. Compared to EGFP mRNA quantity measured after transfection with the scramble siRNA, the mRNA level was very low with anti-EGFP siRNA (Fig. 5). Compared to EGFP inhibition at the protein level, the high decrease at the mRNA level after LFM and Lip100 transfection was partially attributed to the high cytotoxicity induced by these formulations. The 40% decrease after

His-IPEI/LPRi100 or PEG-HpK/LPRi100 transfections was in agreement with the level of EGFP protein inhibition obtained with these LPRi. The value measured upon jetPRIME™ transfection was higher than that observed at the EGFP protein level.

3.5. Comparison between His-IPEI LPRi made with Lip100 and DOTAP liposomes

The inhibition efficiency of anti-EGFP siRNA formulated as His-IPEI LPRi100 was compared to that formulated as His-IPEI DOTAP LPRi (Fig. 6). After 48 h transfection, the inhibition was siRNA-dose dependent in both case. The inhibition was similar at siRNA > 25 nM whatever the liposomes used but dropped drastically under 25 nM with His-IPEI DOTAP LPRi. EGFP expression was inhibited by 65% at 10 nM siRNA with His-IPEI LPRi100 whereas it was 25% with His-IPEI DOTAP LPRi. The maximum inhibition was reached at 10 nM anti-EGFP siRNA with His-IPEI-LPRi100.

3.6. Influence of serum

When HeLa-EGFP cells were transfected with siRNA His-IPEI-LPRi100 in the presence of serum during the first 24 h incubation,

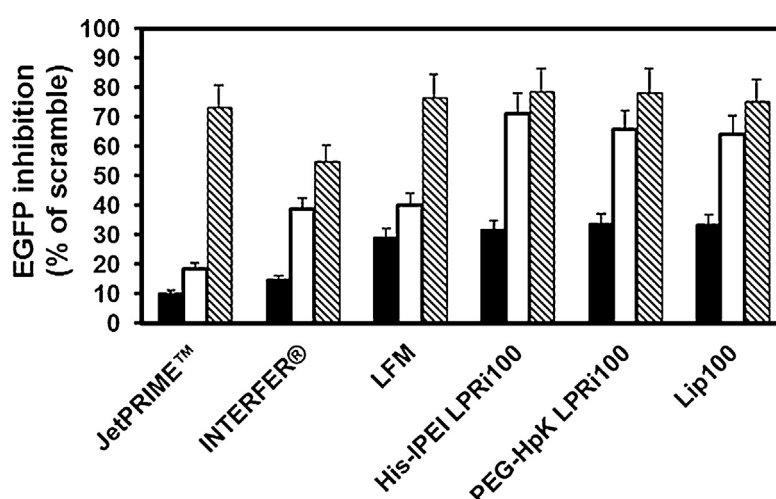


Fig. 3. Comparative inhibition efficiency between siRNA LPRi and commercial vectors. HeLa-EGFP cells were transfected for (black bar) 24 h in the presence of various formulations at 50 nM anti-EGFP or scramble siRNA. The cells were washed and further cultured for 24 h (white bar: 48 h after transfection) or 48 h (hatched bar: 72 h after transfection) in complete culture medium. The cell fluorescence intensity was measured by flow cytometry and expressed as the percentage of fluorescence intensity of anti-EGFP siRNA treated cells to scramble siRNA treated cells (% of scramble).

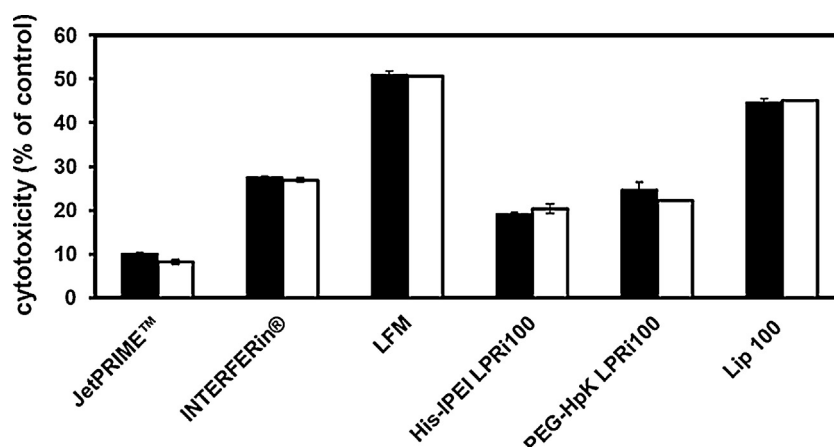


Fig. 4. Cytotoxicity of siRNA formulations. HeLa-EGFP cells were transfected for 24 h in the presence of various formulations at 50 nM anti-EGFP or scramble siRNA. The cells were washed and further cultured for 24 h (black bar: 48 h after transfection) or 48 h (white bar: 72 h after transfection) in complete culture medium. The cytotoxicity was measured at 48 h upon 4 h incubation of cells in the presence of MTT and expressed as the percentage of dead cells in anti-EGFP siRNA or in scramble siRNA treated cells to untreated cells (% of control).

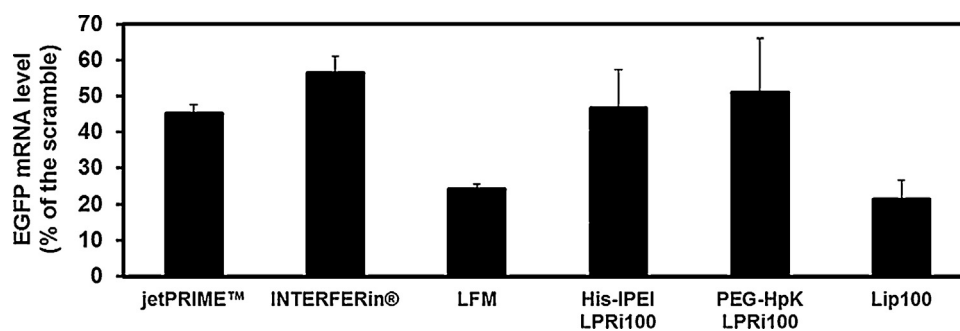


Fig. 5. Comparative EGFP mRNA level in anti-EGFP-siRNA treated cells. HeLa-EGFP cells were transfected for 24 h in the presence of various formulations at 50 nM anti-EGFP or scramble siRNA. The cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. Agarose gel (0.6%) electrophoresis and qRT-PCR reaction were performed as described under Material and Methods. Then, band intensities were measured and expressed as the percentage of intensity in anti-EGFP siRNA treated cells to scramble siRNA treated cells (% of scramble).

the inhibition was about 15% less efficient than when incubation was performed in the absence of serum (Fig. 7). The maximum inhibition was shifted from 10 nM to 25 nM anti-EGFP siRNA in the presence of serum.

3.7. Influence of the polymer

We examined whether LPRI efficiency was influenced by the type of cationic polymer. siRNA were complexed either with pLK, PEG-HpK, IPEI or His-IPEI prior addition of Lip100 to prepare

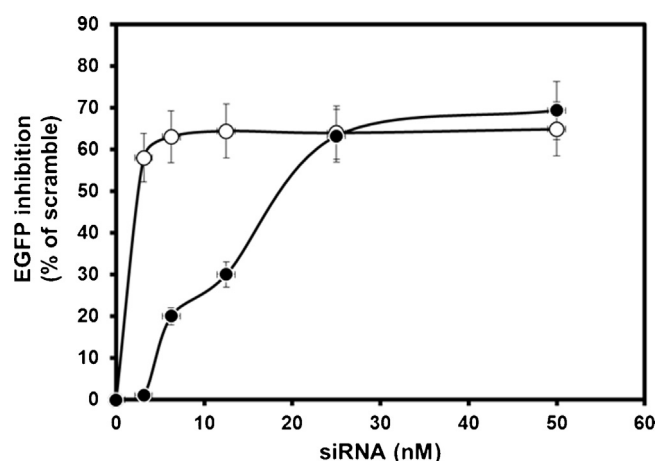


Fig. 6. Comparison between siRNA His-IPEI LPRI100 versus siRNA His-IPEI DOTAP. HeLa-EGFP cells were transfected for 24 h in the absence of serum with various anti-EGFP siRNA formulated with (○) His-IPEI LPRI100 or (●) His-IPEI DOTAP LPRI. The cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. The cell fluorescence intensity was then measured by flow cytometry and expressed as the percentage of fluorescence intensity of treated cells scramble siRNA (% of scramble).

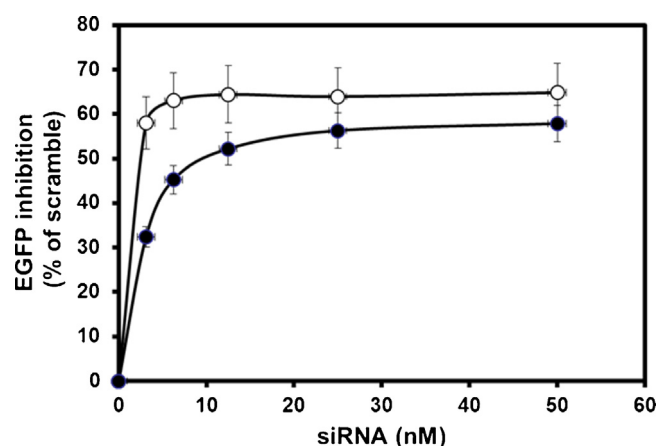


Fig. 7. Influence of the presence of serum on the inhibition effect. HeLa-EGFP cells were transfected for 24 h with various anti-EGFP siRNA formulated as His-IPEI LPRI100 (○) in the absence or (●) the presence of 10% serum. The cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. The cell fluorescence intensity was then measured by flow cytometry and expressed as the percentage of fluorescence intensity of cells treated with scramble siRNA (% of scramble).

Table 3

Specific Luciferase Inhibition with anti-Luc siRNA lipopolyplexes.

Polymers	Luciferase inhibition (% of scramble)		
	Anti-Luc siRNA (nM)		
	50	12.5	6.25
pLK	39	43	2
PEG-His-pLK	89	69	54.5
IPEI	67	65	15
His-IPEI	96	91	44

B16F10-Luc cells were transfected for 24 h in the presence of anti-Luc siRNA formulated as LPri100 made with different cationic polymers. The cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. The luciferase activity (RLU) in cell lysates was measured, normalized and expressed as RLU/mg of protein of cells treated with anti-Luc siRNA to RLU/mg of protein of cells treated with scramble siRNA (% of scramble).

pLK-LPri100, PEG-HpK-LPri100, IPEI-LPri100 or His-IPEI-LPri100, respectively. In order to evaluate LPri efficiency in another cells line and with another mRNA target, the study was carried out with B16F10 cells stably expressing luciferase. When B16F10-Luc were transfected with anti-Luc siRNA, the specific inhibition of luciferase expression after 48 h was siRNA-dose dependent and the highest effect was obtained with His-IPEI-LPri100 and the lowest with pLK-LPri100 (Table 3). When comparing pLK-LPri100 and IPEI-LPri100, the inhibition was higher with the latter as a consequence of the presence of protonable amino groups on IPEI helping the delivery of anti-Luc siRNA in the cytosol. It appears that the presence of grafted histidine residues on the cationic polymer (pLK or IPEI) increased siRNA efficiency. When compared, inhibition efficiency of pLK-LPri100 dropped drastically to 2% at 6.25 nM siRNA while it remained at 54.5% with PEG-HpK-LPri100. Similar effect was observed when comparing IPEI-LPri100 (15%) and His-IPEI-LPri100 (44%). Of note the maximum inhibition of luciferase in B16F10-Luc cells with His-IPEI LPri100 was higher than that obtained for EGFP in HeLa-EGFP cells (~70%) due to the short life time of luciferase compared to that of EGFP.

3.8. Influence of the siRNA/polymer/liposomes ratio

siRNA His-IPEI LPri100 was tested at siRNA/polymer/liposomes weight ratio of 1/3/2. Next we varied the amount of liposomes and polymer, and the inhibition activity of anti-Luc siRNA was tested in B16F10-Luc cells. First, while Pri were not at all efficient to deliver siRNA, the presence of low amount of liposomes increased drastically siRNA activity (Fig. 8). It appears that when Pri were made at a His-IPEI/siRNA weight ratio 2 or 3, the luciferase inhibition was homogenous when Lip100 were added at N/P of 1.3, 2 or 3. Inhibition efficiency was lower when the amount of liposomes was below N/P of 1.3.

4. Discussion

Based on recent results with our original histidine-rich lipopolyplexes for DNA and mRNA transfection, we have explored their efficiency for siRNA transfection. The results confirm that LPri are also more efficient than LRI for siRNA transfection. LPri with KLN25, KLN25:MM27, KLN27 and KLN27:MM30 provide EGFP inhibition higher than that obtained with the corresponding LRI. The highest inhibition is obtained with His-IPEI/LPri100, which in addition exhibit low cytotoxicity. Compared to LRI, His-IPEI/LPri100 are small (60 nm) and highly positively charged. Their high ζ potential may contribute to the better interaction with cell membrane and better transfection efficiency. LPri are also smaller than PRI. Compared to liposomes Lip100 (136 nm; +59 mV) the formation of LRI (126 nm; +59 mV) does not change the global charge,

which is indicative of supramolecular rearrangements involving membrane fusion leading to a multilayer structure with siRNA intercalated between the bilayers as in the case of plasmid DNA (Safinya et al., 2011). The smaller size and the higher ζ potential of His-IPEI LPri100 indicate that LPri formation is different from that of LRI and PRI. Supramolecular rearrangements between PRI and Lip100 indeed lead to a new highly positive charged assembly with size reduction. The presence of small amount of cationic polymer on the LPri surface may explain their enhanced ζ potential. Comparatively, DNA LPD100 exhibited a smaller size and an enhanced ζ potential than corresponding DNA lipopolyplexes (Billiet et al., 2012). With mRNA, we found that the size of lipopolyplexes was smaller than with DNA but unlike siRNA, the global charge decreased (Perche et al., 2011a). The size (142 nm) and the charge (ζ potential of +13 mV) of siRNA/His-IPEI polyplexes are close to that reported for DNA/His-IPEI polyplexes (134 nm; +11 mV) (Billiet et al., 2012) (160 nm; +5 mV) (Bertrand et al., 2011) suggesting that DNA and siRNA polyplexes assemblies are related. PRI made with His-IPEI do not induce any inhibition in the absence of liposomes. This low efficacy is also observed with JetPRIME™ at 48 h post-transfection. This may be due to their weak ζ potential which can limit their interaction with cell membrane, their uptake and thereby their transfection efficiency, but a weak cytosolic release when siRNA was complexed with His-IPEI could be involved. Indeed, large polycations induce strong interaction with small nucleic acids as siRNA or mRNA, which does not facilitate dissociation. This is in line with a study showing that siRNA and mRNA polyplexes were more efficient when siRNA and mRNA were complexed with reducible histidine-rich polymers facilitating their release in the cytosol after polymer cleavage in a reducible medium as cytosol (Read et al., 2005). While His-IPEI PRI cannot provide inhibition of EGFP expression with anti-EGFP siRNA, the efficiency increases dramatically after addition of liposomes Lip100. In literature, PRI made with polylysine or protamine were combined with various types of liposomes comprising cationic lipids including DOTAP, DC-Chol, arginylated-cholesterol, lysinylated-cholesterol, DOTMA (Tagalakakis et al., 2011), DOCSPER (Pelisek et al., 2006), DSAA (Chen et al., 2010) and neural lipids including cholesterol, DOPE, DPPG (Schafer et al., 2010), DPPC (Schafer et al., 2010), PC. Here, we used lipophosphoramidates that have a chemical structure which is bio-inspired from the natural phospholipids present in the cell membranes and thus exhibit a moderate or low toxicity according to *in vitro* (Lamarche et al., 2007; Mevel et al., 2007) and *in vivo* (Lindberg et al., 2012; Picquet et al., 2005) transfection assays. Moreover, liposomes Lip100 exhibit acid membrane destabilization capacity thanks to their imidazole protonable moiety that explains the higher efficiency of His-IPEI LPri100 compared to His-IPEI/DOTAP LPri. The [O,O'-dioleoyl-N-histamine phosphoramidate] lipid of Lip100 promotes endosome membrane fusion and/or permeation after protonation of its imidazole polar head in the acid lumen of endosomes (Mevel et al., 2008b). The relatively better efficiency of His-IPEI LPri100 can be attributed also in part to the presence of the imidazolium polar head of KLN25. Indeed it has been reported that imidazolium group interacts preferentially with RNA (Dobbs et al., 2009). In literature, polymers in lipopolyplexes also varied from PELs (Pelisek et al., 2006; Schafer et al., 2010), chitosan (Wang et al., 2012), poly beta-aminoester (Brito et al., 2008). Here, His-IPEI containing acid protonable imidazole and protonable amine groups also participates in the endosome membrane destabilization and endosome escape of siRNA via a proton sponge effect. This additive effect likely explains the higher efficiency of His-IPEI/LPri100 compared to Lip100 LRI. His-IPEI that contains both imidazoles and protonable amines exhibits a higher proton sponge effect than PEG-HpK and IPEI (Bertrand et al., 2011). Moreover, His-IPEI does not induce cytotoxicity compared to IPEI (Bertrand et al., 2011). The substitution of a certain percentage of

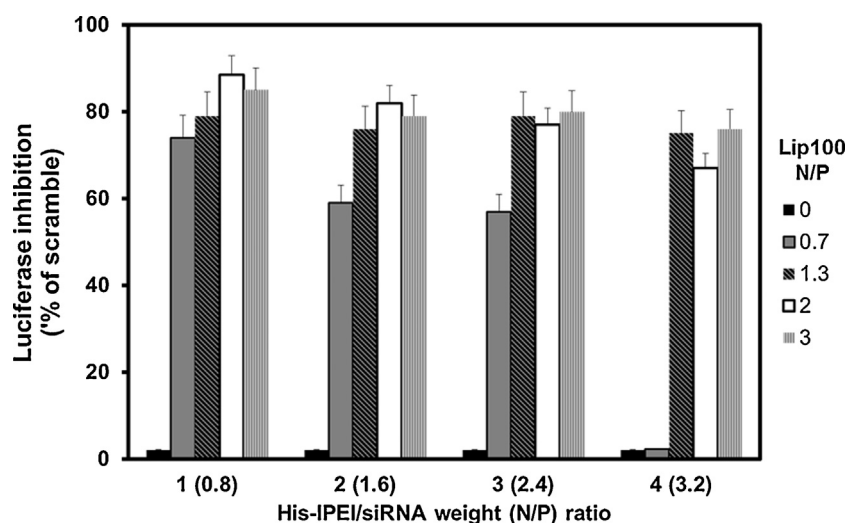


Fig. 8. Influence of the siRNA/polymer/liposomes ratio. B16F10-Luc cells were transfected for 24 h in the presence of anti-Luc siRNA or scramble siRNA formulated as His-IPEI LPRI100 made at different siRNA/Polymer/Liposomes weight ratios. The cells were washed and further cultured for 24 h in complete culture medium. The luciferase activity (RLU) in cell lysates was measured, normalized and expressed as RLU/mg of protein of cells treated with anti-Luc siRNA to RLU/mg of protein of cells treated with scramble siRNA (% of scramble).

the amino groups of PEI indeed decreases the cytotoxicity of the resulting cationic polymer (Doody et al., 2006; Forrest et al., 2004; Thomas and Klivanov, 2002). The presence of carboxyl acid groups from the *N*-acryloyl-L-histidine residues of His-IPEI can be also involved in the low cytotoxicity of this cationic polymer as well as PEI upon carboxyalkylation (Oskuee et al., 2009, 2010; Zintchenko et al., 2008).

Reported TEM images of lipopolyplexes with DNA and mRNA indicated that polyplexes would be encapsulated inside liposomes (Lee and Huang, 1996; Mockey et al., 2007). However, CryoTEM observations of LPD100 comprising Lip100, PEG-HpK and DNA suggested another structural assembly (Perche et al., 2012). LPD100 would exhibit features resembling to intricate assemblies both composed of PRI and LRI moieties, which contrasts with PRI encapsulated inside liposomes. Thus comparative studies of the architectural assembly of DNA, mRNA and siRNA in those lipopolyplexes would be conducted to understand their formation and may be to find a relationship between assembly and transfection efficiency. In a comparative study, we have reported that DNA/KLN25:MM27 lipopolyplexes and PEG-HpK LPD100 lipopolyplexes enter skeletal muscle cells *via* caveolae whereas DNA/His-IPEI polyplexes were taken up *via* clathrin-mediated endocytosis (Billiet et al., 2012). In addition to a strong interaction between siRNA and His-IPEI, differences in the endocytosis process of polyplexes and liposomal formulations can also explain the absence of efficacy for siRNA polyplexes. It is not sure if nucleic acids can escape from caveolae but it is known that caveolae can reach the clathrin-dependant pathway where a pH-mediated membrane destabilization can occur with histidine-rich vectors (Hayer et al., 2010). LPR100 carrying mRNA encoding tumor antigen provided good vaccination effect when injected in the blood circulation (Mockey et al., 2007; Perche et al., 2011a). Here, siRNA transfection performed in the presence of 10% serum is slightly reduced suggesting that His-IPEI LPRi100 transfection efficiency will be not or weakly impaired upon systemic administration.

5. Conclusion

We show that His-IPEI LPRi100 comprising liposomes Lip100 and polymer His-IPEI is a powerful formulation for siRNA transfection. Commercial vectors used as references provided lower efficiency than His-IPEI/LPRi100. Compared to LRI or PRI, the better

efficacy of this formulation is indicative of a synergic effect between liposomes and the polymer. Accordingly to our previous work with DNA and mRNA, it appears that histidinylated lipopolyplexes is a versatile formulation for DNA, mRNA and siRNA transfection and could serve as a platform to develop targeted nucleic acids nanovectors.

Acknowledgements

This work was supported by grants from “Ligue Contre le Cancer Comité Grand Ouest”. M.P. Gosselin received Ph.D. fellowship from Ligue National Contre le Cancer.

References

- Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Rajeev, K.G., Cantley, W.L., Dorkin, J.R., Butler, J.S., Qin, L., Racie, T., Sprague, A., Fava, E., Zeigerer, A., Hope, M.J., Zerial, M., Sah, D.W., Fitzgerald, K., Tracy, M.A., Manoharan, M., Kotliansky, V., Fougereolles, A., Maier, M.A., 2010. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol. Ther.* 18, 1357–1364.
- Aliabadi, H.M., Landry, B., Sun, C., Tang, T., Uludag, H., 2012. Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: where do we stand? *Biomaterials* 33, 2546–2569.
- Bertrand, E., Gonçalves, C., Billiet, L., Gomez, J.P., Pichon, C., Cheradame, H., Midoux, P., Guegan, P., 2011. Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun. (Camb)* 47, 12547–12549.
- Billiet, L., Gomez, J.P., Berchel, M., Jaffres, P.A., Le Gall, T., Montier, T., Bertrand, E., Cheradame, H., Guegan, P., Mevel, M., Pitard, B., Benvegna, T., Lehn, P., Pichon, C., Midoux, P., 2012. Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipopolyplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* 33, 2980–2990.
- Blake, S.J., Bokhari, F.F., McMillan, N.A., 2012. RNA interference for viral infections. *Curr. Drug Targets* 13, 1411–1420.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7297–7301.
- Brito, L., Little, S., Langer, R., Amiji, M., 2008. Poly(beta-amino ester) and cationic phospholipid-based lipopolyplexes for gene delivery and transfection in human aortic endothelial and smooth muscle cells. *Biomacromolecules* 9, 1179–1187.
- Bruno, K., 2011. Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1210–1226.
- Burnett, J.C., Rossi, J.J., 2012. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* 19, 60–71.
- Chen, Y., Bathula, S.R., Li, J., Huang, L., 2010. Multifunctional nanoparticles delivering small interfering RNA and doxorubicin overcome drug resistance in cancer. *J. Biol. Chem.* 285, 22639–22650.

- Chen, Y., Sen, J., Bathula, S.R., Yang, Q., Fittipaldi, R., Huang, L., 2009. Novel cationic lipid that delivers siRNA and enhances therapeutic effect in lung cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 6, 696–705.
- Chono, S., Li, S.D., Conwell, C.C., Huang, L., 2008. An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor. *J. Control. Release* 131, 64–69.
- Daka, A., Peer, D., 2012. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1508–1521.
- Dehshahri, A., Oskuee, R.K., Shier, W.T., Hatefi, A., Ramezani, M., 2009. Gene transfer efficiency of high primary amine content, hydrophobic, alkyl-oligoamine derivatives of polyethylenimine. *Biomaterials* 30, 4187–4194.
- Dobbs, W., Heinrich, B., Bourgogne, C., Donnio, B., Terazzi, E., Bonnet, M.E., Stock, F., Erbacher, P., Bolcato-Bellemin, A.L., Douce, L., 2009. Mesomorphic imidazolium salts: new vectors for efficient siRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 13338–13346.
- Doody, A.M., Korley, J.N., Dang, K.P., Zawaneh, P.N., Putnam, D., 2006. Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine for DNA delivery *in vitro*. *J. Control. Release* 116, 227–237.
- Forrest, M.L., Meister, G.E., Koerber, J.T., Pack, D.W., 2004. Partial acetylation of polyethylenimine enhances *in vitro* gene delivery. *Pharm. Res.* 21, 365–371.
- Gao, J., Yu, Y., Zhang, Y., Song, J., Chen, H., Li, W., Qian, W., Deng, L., Kou, G., Chen, J., Guo, Y., 2012. EGFR-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA delivery in hepatocellular carcinoma. *Biomaterials* 33, 270–282.
- Guo, P., Coban, O., Snead, N.M., Trebley, J., Hoepflich, S., Guo, S., Shu, Y., 2010. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 650–666.
- Haussecker, D., 2012. The business of RNAi therapeutics in 2012. *Mol. Ther.* 1, e8.
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H.H., Helenius, A., 2010. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J. Cell Biol.* 191, 615–629.
- Lamarche, F., Mevel, M., Montier, T., Burel-Deschamps, L., Giamarchi, P., Tripiere, R., Delepine, P., Le Gall, T., Cartier, D., Lehn, P., Jaffres, P.A., Clement, J.C., 2007. Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 18, 1575–1582.
- Lee, R.J., Huang, L., 1996. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.* 271, 8481–8487.
- Li, S.D., Chen, Y.C., Hackett, M.J., Huang, L., 2008. Tumor-targeted delivery of siRNA by self-assembled nanoparticles. *Mol. Ther.* 16, 163–169.
- Li, S.D., Huang, L., 2006. Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 3, 579–588.
- Lindberg, M.F., Carmoy, N., Le Gall, T., Fraix, A., Berchel, M., Lorilleux, C., Couthon-Gourves, H., Bellaud, P., Fautrel, A., Jaffres, P.A., Lehn, P., Montier, T., 2012. The gene transfection properties of a lipophosphoramidate derivative with two phenyl chains. *Biomaterials* 33, 6240–6253.
- Mevel, M., Breuzard, G., Yaouanc, J.J., Clement, J.C., Lehn, P., Pichon, C., Jaffres, P.A., Midoux, P., 2008a. Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative. *Chembiochem* 9, 1462–1471.
- Mevel, M., Montier, T., Lamarche, F., Delepine, P., Le Gall, T., Yaouanc, J.J., Jaffres, P.A., Cartier, D., Lehn, P., Clement, J.C., 2007. Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers. *Bioconjug. Chem.* 18, 1604–1611.
- Mevel, M., Neveu, C., Gonçalves, C., Yaouanc, J.J., Pichon, C., Jaffres, P.A., Midoux, P., 2008b. Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem. Commun. (Camb)*, 3124–3126.
- Midoux, P., Monsigny, M., 1999. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem.* 10, 406–411.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.J., Jaffres, P.A., 2009. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* 157, 166–178.
- Mockey, M., Bourseau, E., Chandrasekhar, V., Chaudhuri, A., Lafosse, S., Le Cam, E., Quesniaux, V.F., Ryffel, B., Pichon, C., Midoux, P., 2007. mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther.* 14, 802–814.
- Oskuee, R.K., Dehshahri, A., Shier, W.T., Ramezani, M., 2009. Alkylcarboxylate grafting to polyethylenimine: a simple approach to producing a DNA nanocarrier with low toxicity. *J. Gene Med.* 11, 921–932.
- Oskuee, R.K., Philipp, A., Dehshahri, A., Wagner, E., Ramezani, M., 2010. The impact of carboxyalkylation of branched polyethylenimine on effectiveness in small interfering RNA delivery. *J. Gene Med.* 12, 729–738.
- Pelisek, J., Gaedtke, L., DeRouchey, J., Walker, G.F., Nikol, S., Wagner, E., 2006. Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under *in vitro* conditions. *J. Gene Med.* 8, 186–197.
- Perche, F., Benvegnu, T., Berchel, M., Lebegue, L., Pichon, C., Jaffres, P.A., Midoux, P., 2011a. Enhancement of dendritic cells transfection *in vivo* and of vaccination against B16F10 melanoma with mannoseylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine* 7, 445–453.
- Perche, F., Gosset, D., Mevel, M., Miramon, M.L., Yaouanc, J.J., Pichon, C., Benvegnu, T., Jaffres, P.A., Midoux, P., 2011b. Selective gene delivery in dendritic cells with mannoseylated and histidylated lipopolyplexes. *J. Drug Target.* 19, 315–325.
- Perche, F., Lambert, O., Berchel, M., Jaffres, P.A., Pichon, C., Midoux, P., 2012. Gene transfer by histidylated lipopolyplexes: a dehydration method allowing preservation of their physicochemical parameters and transfection efficiency. *Int. J. Pharm.* 423, 144–150.
- Pichon, C., Midoux, P., 2013. Mannosylated and histidylated LPR technology for vaccination with tumor antigen mRNA. *Methods Mol. Biol.* 969, 247–274.
- Picquet, E., Le Ny, K., Delepine, P., Montier, T., Yaouanc, J.J., Cartier, D., des Abbayes, H., Ferec, C., Clement, J.C., 2005. Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for *in vivo* DNA delivery. *Bioconjug. Chem.* 16, 1051–1053.
- Read, M.L., Singh, S., Ahmed, Z., Stevenson, M., Briggs, S.S., Oupicky, D., Barrett, L.B., Spice, R., Kendall, M., Berry, M., Preece, J.A., Logan, A., Seymour, L.W., 2005. A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 33, e86.
- Safinya, C.R., Ewert, K.K., Leal, C., 2011. Cationic liposome–nucleic acid complexes: liquid crystal phases with applications in gene therapy. *Liq. Cryst.* 38, 1715–1723.
- Schafer, J., Hobel, S., Bakowsky, U., Aigner, A., 2010. Liposome–polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. *Biomaterials* 31, 6892–6900.
- Singha, K., Namgung, R., Kim, W.J., 2011. Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic Acid Ther.* 21, 133–147.
- Sonawane, N.D., Szoka Jr., F.C., Verkman, A.S., 2003. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine–DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 44826–44831.
- Strumberg, D., Schultheis, B., Traugott, U., Vank, C., Santel, A., Keil, O., Giese, K., Kaufmann, J., Dreves, J., 2012. Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 50, 76–78.
- Tabernero, J., Shapiro, G.I., Lorusso, P.M., Cervantes, A., Schwartz, G.K., Weiss, G.J., Paz-Ares, L., Cho, D.C., Infante, J.R., Alsina, M., Gounder, M.M., Falzone, R., Harrop, J., White, A.C., Toudjarska, I., Bumcrot, D., Meyers, R.E., Hinkle, G., Svrzikapa, N., Hutabarat, R.M., Clausen, V.A., Cehelsky, J., Nochur, S.V., Gamba-Vitalo, C., Vaishnaw, A.K., Sah, D.W., Gollob, J.A., Burris 3rd, H.A., 2013. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov.* 3, 406–417.
- Tagalakakis, A.D., He, L., Saraiva, L., Gustafsson, K.T., Hart, S.L., 2011. Receptor-targeted liposome–peptide nanocomplexes for siRNA delivery. *Biomaterials* 32, 6302–6315.
- Thomas, M., Klibanov, A.M., 2002. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14640–14645.
- Vader, P., Crielard, B.J., van Dommelen, S.M., van der Meel, R., Storm, G., Schiffelers, R.M., 2012. Targeted delivery of small interfering RNA to angiogenic endothelial cells with liposome–polycation–DNA particles. *J. Control. Release* 160, 211–216.
- Wallace, L.M., Liu, J., Domire, J.S., Garwick-Coppens, S.E., Guckes, S.M., Mendell, J.R., Flanagan, K.M., Harper, S.Q., 2012. RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity *in vivo*: implications for a targeted FSHD therapy. *Mol. Ther.* 20, 1417–1423.
- Wang, B., Zhang, S., Cui, S., Yang, B., Zhao, Y., Chen, H., Hao, X., Shen, Q., Zhou, J., 2012. Chitosan enhanced gene delivery of cationic liposome via non-covalent conjugation. *Biotechnol. Lett.* 34, 19–28.
- Zhang, S., Zhi, D., Huang, L., 2012. Lipid-based vectors for siRNA delivery. *J. Drug Target.* 20, 724–735.
- Zintchenko, A., Philipp, A., Dehshahri, A., Wagner, E., 2008. Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjug. Chem.* 19, 1448–1455.

Marie-Pierre GOSSELIN

Vectorisation de petits acides nucléiques par les lipopolyplexes : Application au cancer du sein

Au cours de cette thèse, j'ai utilisé des complexes composés d'acides nucléiques, d'un polymère cationique et de liposomes cationiques appelés Lipopolyplexes pour formuler des siRNA (LPRi) et un leurre ADN (LPD) afin d'inhiber la croissance des cellules 4T1, un modèle murin de carcinome mammaire. Dans une première étude, des injections systémiques ou endotrachéales de LPRi avec des siRNA anti-luciférase n'ont pas permis d'inhiber l'expression de la luciférase dans des métastases pulmonaires induites par des cellules 4T1-luciférase. À partir de ces résultats, les LPRi ont été améliorés en ciblant les cellules 4T1 avec le peptide uPA et/ou RGDc ou l'acide folique incorporés aux liposomes selon diverses approches. Les formulations obtenues ont été caractérisées, leur endocytose et l'effet siRNA mesurés *in vitro*. Cette deuxième partie a permis d'établir que les LPRi décorés avec du folate étaient la meilleure formulation ciblée. Dans une troisième partie, l'inhibition de la prolifération des cellules 4T1 a été recherchée en ciblant le facteur de transcription STAT3. Des LPRi anti-STAT3 ont montré une très bonne efficacité pour inhiber STAT3, mais sans effet antiprolifératif significatif. Des LPD anti-STAT3 ont montré un très bon effet antiprolifératif, celui-ci étant renforcé lorsqu'une co-délivrance siRNA/leurre ADN (LPRiD) a été réalisée. *In vivo*, un délai de la croissance des tumeurs 4T1 a été observé après co-délivrance siRNA/leurre ADN. Cette thèse a permis de montrer l'efficacité des lipopolyplexes pour la délivrance combinée de siRNA et de leurre ADN dans les cellules tumorales 4T1. Ils indiquent que des études sont cependant nécessaires pour augmenter leur délivrance *in vivo* dans la tumeur.

Mots-clés : siRNA, leurre ADN, lipopolyplexes, modèle 4T1.

Vectorization of small nucleic acids by lipopolyplexes : Application to breast cancer

During this thesis, I used complexes made with nucleic acids, cationic polymer and cationic liposomes called Lipopolyplexes to formulate siRNA (LPRi) and DNA molecular decoy (LPD) in order to inhibit the growth of 4T1 cells, a murine model of mammary carcinoma. In a first study, systemic or endotracheal injections of LPRi comprising anti-luciferase siRNA did not allow luciferase inhibition in pulmonary metastases induced by 4T1-Luc cells. From these results, LPRi were improved by targeting 4T1 cells using incorporation, by different means, of uPA and/or RGDc peptide or folic acid in liposomes. Resulted formulations were characterized, their internalization and siRNA transfection efficiency were measured *in vitro*. This second part showed that folate targeting of LPRi was the best formulation. In a third part, proliferation inhibition of 4T1 cells was investigated by targeting the STAT3 transcription factor. Anti-STAT3 siRNA LPRi showed very good efficacy in inhibiting STAT3, but without significant antiproliferative effect. Anti-STAT3 decoy LPD showed a very good antiproliferative effect, the latter being reinforced when co-delivery siRNA/DNA decoy (LPRiD) was performed. *In vivo*, a growth retardation of 4T1 tumors was observed after co-delivery siRNA/DNA decoy. This thesis demonstrated the effectiveness of lipopolyplexes for combined delivery of siRNA and DNA decoy in the 4T1 tumor cells. Some studies are however required to increase their *in vivo* delivery into the tumor.

Keywords : siRNA, DNA decoy, lipopolyplexes, 4T1 model.



Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
CS 80054
45071 Orléans Cedex 2

