

Université de Montréal

**Micelles polyioniques ternaires pour la libération
intracellulaire d'oligonucléotides**

par

Nada Wazen

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en sciences (M.Sc.)
en Sciences pharmaceutiques
option technologie pharmaceutique

Novembre, 2010

© Nada Wazen, 2010

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Micelles polyioniques ternaires pour la libération intracellulaire d'oligonucléotides

Présenté par :
Nada Wazen

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Maxime Ranger, président-rapporteur
Pr. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche
Dr. Patrick Gosselin, membre du jury

RÉSUMÉ

Les oligonucléotides (ONs) antisens présentent un fort potentiel en tant qu'agents thérapeutiques. Toutefois, leurs propriétés physicochimiques limitent leur utilisation en thérapie génique. Pour pallier aux divers obstacles, des systèmes de vectorisation, tels que les micelles polyioniques (PICMs), ont été développés. Grâce à leur structure unique, les micelles protègent l'ON contre une dégradation prématurée et le couplage d'un ligand à leur surface augmente leur spécificité et leur internalisation. Dans d'autres systèmes, un polymère adjuvant aux propriétés pH-sensibles peut être ajouté pour faciliter la sortie de l'endosome et augmenter l'efficacité de l'ON.

L'objectif général de ce mémoire était de mettre au point des PICMs ternaires ciblées pour l'administration d'ONs. Ces micelles assureraient à la fois l'internalisation cellulaire de leur cargaison en interagissant avec des récepteurs cellulaires et sa fuite de l'endosome grâce à un mécanisme de déstabilisation de la membrane endosomale. Pour cela, des PICMs composées d'un copolymère cationique de type poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(méthacrylate d'(alkylamino)éthyle) et d'un copolymère d'acide méthacrylique ont été préparées. Les propriétés physicochimiques de ces vecteurs ont démontré qu'ils permettaient une condensation efficace de l'acide nucléique et ce, indépendamment de la nature du polymère cationique et de l'acide nucléique. Finalement, une approche de couplage par pont disulfure a été développée afin de greffer au copolymère un fragment d'anticorps dirigé contre les récepteurs de la transferrine.

En conclusion, ces travaux démontrent la versatilité et le potentiel des PICMs ternaires en tant que vecteurs d'acide nucléique, et proposent une méthodologie de couplage d'un ligand afin de formuler des PICMs ciblées.

Mots-clés : micelle polyionique, oligonucléotide antisens, copolymère membrano-lytique, polymère cationique, anticorps, polymérisation radicalaire par transfert d'atome, pARNi.

ABSTRACT

Antisense oligonucleotides (ONs) present great potential as therapeutic agents. However, their physicochemical properties hinder their use in gene therapy. Targeting systems, such as polyion complex micelles (PICMs), have been proposed to circumvent the main hurdles related to ON delivery. Their unique core/shell structure can protect the ON against premature degradation and the coupling of a ligand on their surface can increase their specificity and internalization. In other systems, a polymer with pH-sensitive properties can be added to facilitate the release of the ON from the endosome and increase its efficiency.

The present work was aimed at optimizing ternary PICMs targeted for the delivery of antisense ON. Such systems would provide both cellular internalization of cargo by interaction with receptors on the surface of cell membranes and escape from the endosome through a mechanism of destabilization of the endosomal membrane. PICMs composed of cationic copolymers of poly(ethylene glycol)-*bloc*-poly((alkylamino)ethyl methacrylate) with a methacrylic acid copolymer adjuvant were prepared. Their physicochemical properties suggest that efficient complexation of nucleic acids was obtained, regardless of the nature of the cationic polymer and the nature of the nucleic acid. Finally, a synthetic approach was developed for the conjugation of an antibody fragment directed against the transferrin receptor *via* a labile disulfide bond at the end of the cationic copolymer.

In conclusion, the work presented herein displays the versatility and potential of ternary PICMs as vehicles for the delivery of ONs and also provides a method for the conjugation of a ligand to generate targeted ternary PICMs.

Keywords : polyion complex micelle, antisense oligonucleotides, cationic copolymer, membrano-lytic copolymers, antibody, atom transfer radical polymerization, siRNA.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT.....	ii
Liste des tableaux.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	17
1. LA THÉRAPIE GÉNÉRIQUE	17
1.1. Les ribozymes	18
1.2. Les ONs antisense	20
1.3. Les ARNis	22
2. Les modifications chimiques du matériel génétique	24
2.1. Les oligonucléotides de première génération.....	25
2.2. Les oligonucléotides de deuxième génération.....	27
2.3. Les oligonucléotides de troisième génération	27
2.4. Les essais cliniques	28
3. L'ADMINISTRATION DE GÈNES.....	29
3.1. Les méthodes physiques	30
3.2. La vectorisation	32
3.3. Les vecteurs viraux.....	33
3.4. Les vecteurs synthétiques.....	35
3.4.1.1. ... Les vecteurs lipidiques : les liposomes et les lipoplexes.....	35
3.4.1.2. ... Les vecteurs polymères.....	40
3.4.1.2.1. Les nanoparticules	40
3.4.1.2.2. Les polyplexes.....	42
3.4.1.2.3. Les micelles polyioniques.....	45
3.4.1.2.3.1. Définition.....	45

3.4.1.2.3.2. La formation des PICMs	47
3.4.1.2.3.3. Préparation des PICMs	49
3.4.1.2.3.4. Structure des copolymères cationiques.....	50
4. TRAFIC EXTRA ET INTRACELLULAIRE	54
4.1. Le ciblage passif	54
4.2. Le ciblage actif	56
4.2.1. Les récepteurs à la transferrine et l'antigène de surface CD71	60
4.3. Mécanisme d'internalisation cellulaire actif : l'endocytose.....	61
4.4. Sortie des endosomes	63
5. CONCLUSION	65
BIBLIOGRAPHIE.....	66
6. Hypothèses de recherche & Objectifs	78
Objectifs généraux.....	78
Objectifs spécifiques	79
Chapitre II. Résultats & Discussion	81
1. Synthèse des polymères cationiques	81
1.1. Synthèse d'une banque de polymères.....	84
1.2. Synthèse des polymères utilisés dans la préparation des micelles	87
2. Préparation et caractérisation des micelles polymères	90
2.1. Micelles binaires.....	92
2.2. Micelles ternaires.....	94
3. Caractérisation de l'incorporation d'acides nucléiques dans les micelles.....	98
4. Effet de la nature de l'acide nucléique sur la formation des micelles	103
5. Préparation et caractérisation des micelles ciblées.....	108
5.1. Stratégie de couplage.....	109
5.1.1. Synthèse du copolymère cationique fonctionnalisé.....	111
5.1.2. Préparation de l'anticorps Fab'	115
5.1.3. Couplage de l'anticorps (Fab') au copolymère cationique	118
5.1.4. Optimisation des conditions de couplage	121

6.	Capture cellulaire des picms ciblées.....	123
7.	Conjugaison du Fab' à un copolymère anionique	125
	Chapitre III. Conclusion & Perspectives.....	127
	BIBLIOGRAPHIE	129
	CHAPITRE IV. PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	134
	ANNEXE 1	146
	ANNEXE 2.....	147
	ANNEXE 3	148

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Administration des gènes d'intérêt par méthodes physiques.....	31
Tableau 1.2. Propriétés des différents vecteurs viraux utilisés en thérapie génique.....	34
Tableau 1.3. Propriétés de quelques formulations de PICMs utilisées en thérapie génique pour le transport de matériel génique.....	50
Tableau 1.4. Présentation de divers ligands, de leurs récepteurs et de leurs cibles utilisés en thérapie génique <i>in vitro</i>	58
Tableau 2.1. Banque de copolymères cationiques préparés et leur caractérisation.....	85
Tableau 2.2. Caractérisation des copolymères cationiques sélectionnés.....	88
Tableau 2.3. Influence de l'ordre d'addition des composantes sur les propriétés colloïdales de micelles ternaires de PEG ₆₈ -b-PAEMA ₂₄	98
Tableau 2.4. Caractérisation des acides nucléiques étudiés	104
Tableau 2.5. Effet de la nature du matériel génétique sur les propriétés colloïdales des PICMs binaires et ternaires.....	106
Tableau 2.6. Caractérisation des polymères de PEG fonctionnalisés par un groupement thiol.....	113
Tableau 2.7. Caractérisation du copolymère cationique fonctionnalisé.....	114
Tableau 2.8. Résumé des principales conditions de couplages du Fab' en bout de chaîne du copolymère ationique	122
Tableau 2.9. Propriétés colloïdales des formulations.....	124

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Représentation schématique du mécanisme d'action des ribozymes à tête marteau.....	19
Figure 1.2. Représentation schématique des mécanismes d'action possibles des ONs.....	21
Figure 1.3. Représentation schématique du mécanisme d'action des ARNis et des pARNis pour l'inhibition de la synthèse protéique.....	24
Figure 1.4. Représentation des dérivés d'acides nucléiques de première, deuxième et troisième générations.....	26
Figure 1.5. Pathologies étudiées en thérapie génique. Le pourcentage correspond aux protocoles d'essais cliniques menés en 2009 pour chacun des domaines.....	29
Figure 1.6. Principales méthodes d'administration de gènes utilisées en thérapie génique. Le pourcentage correspond aux protocoles d'essais cliniques menés en 2009 pour chacun des domaines.....	30
Figure 1.7. Représentation schématique de la structure d'un liposome (A) et d'un lipoplexe (B).....	36
Figure 1.8. Structure des principaux lipides cationiques utilisés dans la préparation des lipoplexes.....	37
Figure 1.9. Mécanisme de « flip-flop ».....	39
Figure 1.10. Représentation schématique de deux types de NPs, soit des nanocapsules et des nanosphères.....	41
Figure 1.11. Représentation schématique de polyplexes (A) et de la structure des principaux polymères cationiques utilisés dans la préparation des polyplexes (B).....	43
Figure 1.12. Mécanisme « d'éponge à protons ». La protonation du polymère sensible au pH (vert) entraîne un accroissement d'influx de protons (et de contre-ions). L'augmentation de la pression osmotique induit la rupture de l'endosome et la libération de son contenu dans le cytosol.....	44

Figure 1.13. Représentation schématique du mécanisme de formation de micelles polymères (A) et de PICMs (B).....	46
Figure 1.14. Mécanisme détaillé de la PRTA.....	52
Figure 1.15. Mécanisme général de la PRTA où R-X est le dérivé d'halogène (espèce dormante), M_t représente le métal de transition, Y le contre-ion (le plus souvent un halogène) et $R\bullet$ est la chaîne croissante radicalaire (espèce vivante).....	53
Figure 1.16. Mécanisme de la PAOC de l'oxyde d'éthylène par le <i>tert</i> -butyle mercaptan.....	54
Figure 1.17. Représentation schématique de l'effet EPR.....	56
Figure 1.18 Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline de type IgG.....	59
Figure 1.19. Représentation schématique des diverses voies d'endocytoses (A) et représentation schématique de l'internalisation cellulaire par endocytose récepteur-dépendante de PICMs (B).....	63
Figure 1.20. Représentation schématique du changement de conformation d'un copolymère d'acide méthacrylique en fonction du pH.....	65
Figure 2.1. Voies de synthèse utilisées pour la préparation du copolymère cationique par PRTA (A) et pour la protection de l'amine primaire par le bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl) aminoéthyle (AEMABoc) (B).....	82
Figure 2.2. Spectre ^1H RMN du PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄	86
Figure 2.3. Titrage potentiométrique des copolymères PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄ (■), PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅ (●) et PEG ₆₈ - <i>b</i> -P(AEMA ₁₃ - <i>co</i> -DMAEMA ₁₁) (▲).....	90
Figure 2.4. Formation des micelles polyioniques ternaires et mécanisme de libération du matériel génétique.....	91

- Figure 2.5. Effet du ratio molaire N/P sur le diamètre hydrodynamique moyen (\blacklozenge), l'intensité de la lumière diffusée (\blacktriangle) et l'IP (\blacksquare) de micelles binaires de (A) PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄, (B) PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅, (C) PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁). Moyenne \pm ET (n=3).....93
- Figure 2.6. Effet du ratio molaire N/COOH sur le diamètre hydrodynamique moyen (\blacklozenge), l'intensité de la lumière diffusée (\blacktriangle) et l'IP (\blacksquare) de micelles de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄/P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀). Moyenne \pm ET (n=3).....95
- Figure 2.7. Distribution moyenne du diamètre hydrodynamique de micelles binaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ (—), PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ (- - -), PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) (.....) avec ON (A) ou avec le copolymère P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) (B). Les micelles ont été préparées à leurs ratios N/P et N/COOH idéaux respectifs.....96
- Figure 2.8. Effet d'une addition séquentielle d'ON sur le diamètre hydrodynamique moyen (\blacklozenge), l'intensité de la lumière diffusée (\blacktriangle) et l'IP (\blacksquare) de micelles ternaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄. La concentration en ON est exprimée en pourcentage molaire d'ON par rapport à la quantité molaire totale de groupements ionisables anioniques (P+COOH). Moyenne \pm ET (n=3).....97
- Figure 2.9. Gel d'acrylamide (4-20%) en condition dénaturante de PICMs ternaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ (A), PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ (B), et de PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) (C), préparées à un ratio de N/(P+COOH) variant de 0,25 à 2,0.....99
- Figure 2.10. Fluorescence du BrEt lors de l'incorporation de l'ON dans les micelles binaires(A) et ternaires (B). Les micelles binaires et ternaires ont été préparées à partir des copolymères de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄(\blacksquare), PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅(\blacktriangle) et de PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) (\bullet). La contribution de l'ON représente 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles ternaires de copolymères cationiques/ P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) /ODNs. Moyenne \pm ET (n=3).....101

- Figure 2.11. Fluorescence du BrEt générée suite à l'addition d'héparine à des micelles binaires (A) et ternaires (B). Les micelles binaires et ternaires ont été préparées à partir des copolymères de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ (■), PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ (▲) et de PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) (●), avec une même concentration molaire d'ON. La contribution de l'ON représente 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles ternaires. L'intensité de fluorescence est corrigée par rapport à l'intensité du BrEt non complexé. Moyenne ± ET (n=3).....103
- Figure 2.12. Gel d'acrylamide, en conditions dénaturantes (4-20%), de micelles binaires (A) et ternaires (B) préparées à partir du copolymère de PEG₆₈-*b*-AEMA₂₄ et du pARNi à des ratios N/P et N/(P+COOH) variant de 0,25 à 2,0.....108
- Figure 2.13. Structure des principaux agents de couplage employés lors de la conjugaison d'une molécule de reconnaissance (A) et représentation schématique de la conjugaison d'une molécule de reconnaissance à un copolymère cationique *via* un bras espaceur (B).....111
- Figure 2.14. Voie de synthèse du pyridyl-SS-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉.....112
- Figure 2.15. Spectre ¹H RMN du pyridyl-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉.....115
- Figure 2.16. Principales étapes dans la préparation du fragment Fab' de l'anticorps.....116
- Figure 2.17. Spectres de spectrométrie de masse et déconvolution des spectres pour les fragments d'anticorps F(ab)₂ (A) et Fab' (B) et gel d'acrylamide non dénaturant (10%) de l'anticorps IgG1, du fragment F(ab)₂ et du fragment Fab' (C).....117
- Figure 2.18. Voie de couplage de l'anticorps (Fab') au copolymère cationique de pyridile-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ (A) et spectre UV-visible du HS-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ et du Fab'-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ (B).....118
- Figure 2.19. Gel d'acrylamide (10 %) du Fab'-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ dans des conditions non dénaturantes.....121

Figure 2.20. Capture cellulaire des micelles ciblées de Fab'-S-S-PEG ₈₀ -b-PAEMA ₁₉ /PEG ₆₈ -b-PAEMA ₂₄ /ON-F et des micelles non ciblées de PEG ₆₈ -b-PAEMA ₂₄ /ON-F sur les cellules PC-3 évaluée par cytométrie en flux.....	125
Annexe 1. Spectre de spectrométrie de masse et déconvolution du spectre du Fab ₂	146
Annexe 2. Spectre de spectrométrie de masse et déconvolution du spectre Fab'.....	147
Annexe 3. Spectre de spectrométrie de masse (LCMS) du Fab'-S-S-PEG ₈₀ -b-PAEMA ₁₈ . La déconvolution du spectre ne peut être obtenue dû à l'hétérogénéité du produits et de la nature multichargée.....	148

ABRÉVIATIONS

α	degré d'ionisation
$^1\text{H RMN}$	résonance magnétique nucléaire du proton
ADN	acide désoxyribonucléique
AEMA·HCl	hydrochlorure de méthacrylate 2-aminoéthyle
AEMABOC	méthacrylate de 2-(N-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)éthyle
ANP	acide nucléique peptidique
ANV	acide nucléique verrouillé
ARN	acide ribonucléique
ARNi	acide ribonucléique interférent
ARNm	acide ribonucléique messager
Asp(DET)	poly(aspartamide) N-(2-aminoéthyle)-2-aminoéthyle
Boc ₂ O	bis(<i>tert</i> -butyle dicarbonate)
BrEt	bromure d'éthidium
CCA	concentration critique d'agrégation
CES	chromatographie d'exclusion stérique
CMC	concentration micellaire critique
DCM	dichlorométhane
DICER	ribonucléase de type III
DLD	diffusion de la lumière en mode dynamique
DMAEMA	méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle
DOGS	dioctadécylamidoglycylspermine
DOPE	dioléoylphosphatidyl éthanolamine
DOPSA	dioléoyl-oxypropyldiméthylammonium amidospermine
DOTAP	dioléoyl triméthylammonium propane
DOTMA	chlorure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonim
DOX	doxorubicine
EPR	perméabilité et rétention vasculaire accrues (<i>enhanced</i>)

	<i>permeability and retention effect</i>)
ERP	effet radicalaire persistant (<i>persistent radical effect</i>)
FANA	acide nucléique 2'-désoxy-2'-fluoro- β -D-arabino
HMTETA	1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine
HS-PEG	poly(éthylène glycol) fonctionnalisé par un groupement thiol
IP	indice de polymolécularité (dans le cas des polymères) ou de polydispersité (dans le cas de la taille des micelles)
K_{act}	constante de vitesse d'activation
$K_{désact}$	constante de vitesse de désactivation
K_{cps}	kilocoups
K_p	constante de vitesse de propagation
K_t	constante de vitesse de terminaison
LCMS-TOF	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol
m/m	masse/masse
m/z	rapport masse sur charge
MEA-HCl	hydrochlorure de mercaptoéthylamine
MeO-PEG-Br	α -(2-bromoisobutyrylate-)- ω -méthoxy PEG
MeO-PEG-OH	polyéthylène glycol monométhyle éther
MF	oligonucléotide antisens de type morpholino
M_n	masse molaire en nombre
MPS	système phagocytaire mononucléé
M_w	masse molaire moyenne en masse
NP	nanoparticule
OE	oxyde d'éthylène (<i>ethylene oxide</i>)
ON	oligonucléotide
ON-P	ON antisens phosphorothioate dont la séquence d'acide nucléique est similaire à celle du FANA (utilisé dans le cadre de ce projet de maîtrise)

ON-PO	Oligonucléotide antisens phosphodiester
ON-PS	oligonucléotide antisens phosphorothioate
P(MAA _{50-co} -EA _{40-co} -BMA ₁₀)	poly(acide méthacrylique-co-acrylate d'éthyle-co-méthacrylate de butyle) avec 10, 40 et 10 unités de répétition respectivement
PAMAM	poly(amidoamine)
pARNi	petit acide ribonucléique interférent (<i>short interfering RNA</i>)
PAOC	polymérisation anionique par ouverture de cycle
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	poly(éthylène glycol)
PEI	poly(éthylèneimine)
PICM	micelle polyionique (<i>polyion complex micelle</i>)
PLys	poly(lysine)
PRTA	polymérisation radicalaire par transfert d'atome
PTMAEMA	poly(méthacrylate de 2-(triméthylamino)éthyle)
PVP	poly(<i>N</i> -vinyl-2-pyrrolidone)
RAFT	transfert de chaîne avec addition-fragmentation réversible (<i>reversible fragmentation chain transfer polymerization</i>)
RISC	complexe ribonucléoprotéique (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNAse H	ribonucléase H
SPM	système phagocytaire mononucléé
SUV	liposome de petite taille unilamellaire (<i>small unilamellar vesicles</i>)
tBu	<i>tert</i> -butyl
TFO	structure en triple hélice (<i>triplex-forming oligonucleotide</i>)
Tg	température de transition vitreuse
THF	tétrahydrofurane
Tris	tris(hydroxyéthyl)aminoéthane
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

*« À mes parents, Raymond & Mony, pour
leur soutien et leur amour »*

REMERCIEMENTS

Tout au long de ces années d'études, j'ai été entourée de personnes extraordinaires qui m'ont permis de réaliser ma maîtrise dans une ambiance de travail très agréable.

J'aimerais particulièrement remercier mon directeur de recherche, Professeur Jean-Christophe Leroux, qui m'a acceptée au sein de son équipe et a dirigé ma formation. L'enthousiasme pour la science, l'intuition scientifique, la ténacité et la patience dont il fait preuve m'ont permis de réaliser ces projets de recherche et ont grandement contribué à la richesse de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent aux membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce mémoire de maîtrise.

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux que j'ai eu la chance de croiser au laboratoire et à ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail : Marie-Hélène, Núria et Mahmoud, ainsi qu'à tous les collègues dont j'ai eu le privilège de connaître et de côtoyer durant ces années de maîtrise. Mes remerciements vont également à Jeanne, qui m'a aidée et conseillée, particulièrement au cours des derniers mois passés au laboratoire et qui a également pris le temps de réviser et corriger ce mémoire. Merci

Une pensée à mes collègues du MDEIE, Vanessa, Corinne et Éric, pour leur encouragement et leur appui pendant la rédaction du mémoire. Merci d'avoir assuré ma relève lors de mes jours de rédaction.

Finalement, je tiens à remercier chaleureusement mes parents, Raymond et Mony, ma famille et mes amis, qui m'ont encouragée à poursuivre mes études. Plus particulièrement Rima et Paul, pour avoir lu et commenté, à maintes reprises, mon mémoire. Leur soutien a été un atout important dans la réussite de mes objectifs.

CHAPITRE I. INTRODUCTION

1. LA THÉRAPIE GÉNIQUE

Les récentes avancées technologiques ont permis d'identifier des mutations génétiques impliquées dans le développement de nombreuses pathologies humaines, telles que les infections virales, les maladies inflammatoires et de nombreux cancers (Kurreck 2003). Ces mutations conduisent généralement à la synthèse de protéines défectueuses ou à une dérégulation de l'expression de celles-ci et peuvent perturber les mécanismes moléculaires et cellulaires fondamentaux (Biet *et al.* 2003). La thérapie génique cible l'origine de telles pathologies et consiste à introduire du matériel génétique exogène dans les cellules cibles de patients (Wolff et Lederberg 1994). Ce matériel a pour fonction de modifier l'expression d'un gène, dans le but de réparer un défaut génétique, ou bien de moduler la synthèse de protéines responsables de la maladie (Kakizawa et Kataoka 2002, Biet *et al.* 2003, Mintzer et Simanek 2009). À l'origine, la thérapie génique a été développée surtout pour traiter les maladies héréditaires, telles l'hémophilie ou la myopathie de Duchenne.

La première grande stratégie de la thérapie génique consiste à introduire dans le génome de la cellule hôte un vecteur d'expression capable de conduire à la synthèse d'une protéine d'intérêt, compensant ainsi le défaut génétique. L'expression du gène introduit est généralement transitoire, mais peut être prolongée si le vecteur d'expression s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Les acides désoxyribonucléiques (ADNs) plasmidiques sont particulièrement utilisés puisqu'ils peuvent s'intégrer dans le génome hôte par un mécanisme de recombinaison homologue. La similitude que l'ADN plasmidique partage avec la région cible stimule son intégration dans le génome au moment de la mitose cellulaire. L'information génétique initialement portée par la cellule hôte est donc perdue au profit de celle présente sur l'ADN plasmidique. Plusieurs paramètres influencent l'efficacité d'insertion de l'ADN plasmidique tels la nature, la taille et le degré d'homologie qu'il partage avec sa cible. Cette approche permet d'assurer une insertion

permanente de l'information génétique dans le génome de l'hôte et offre un traitement permanent de la maladie. Toutefois, l'évènement de recombinaison homologue a lieu à une fréquence faible, soit de près d'une réaction de recombinaison par 10^5 à 10^8 de cellules traitées (Biet *et al.* 2003). De plus, ce mécanisme peut conduire à une insertion aléatoire du matériel génétique dans le génome de la cellule hôte et peut perturber ou inactiver certaines protéines essentielles à son fonctionnement.

La deuxième grande approche vise à moduler la synthèse d'une protéine au niveau de la transcription ou de la traduction de l'acide ribonucléique messenger (ARNm). À cette fin, divers acides nucléiques peuvent être utilisés tels que les ribozymes, les acides ribonucléiques interférents (ARNis) et les oligonucléotides (ONs) antisens.

1.1. Les ribozymes

Au début des années 1980, Cech (1981) et Altman (1983) démontrèrent pour la première fois le potentiel catalytique des ribozymes. Ces derniers sont des molécules d'ARN capable de cliver de manière spécifique la liaison phosphodiester des simples brins d'ARNm *via* une réaction de transestérification ou d'hydrolyse (figure 1.1) (Doherty et Doudna 2001). Depuis, une grande variété de ribozymes a été découverte et caractérisée chez les eucaryotes, les virus et chez certaines bactéries. Plus particulièrement, le ribozyme à tête marteau (*hammerhead ribozyme*), découvert dans le génome de viroïdes de plantes, est l'un des plus utilisés en thérapie génique (Aboul-Fadl 2005). Ce ribozyme est caractérisé par la présence d'un site catalytique et de deux bras capables de s'apparier de manière complémentaire avec l'ARNm cible par des interactions de type Watson-Crick. Les ribozymes à tête marteau clivent spécifiquement les triplets NUH (où N représente n'importe quel nucléotide, U est l'uridine et H représente également n'importe quel nucléotide, à l'exception de la guanosine). En l'occurrence, les triplets AUC et GUC sont les séquences les plus efficacement clivées par les ribozymes. Les triplets possédant une

cytidine ou une adénosine en deuxième position peuvent également être scindés par ce ribozyme, mais à une vitesse catalytique plus lente (Kurreck 2003). Les ribozymes peuvent être modifiés chimiquement afin d'accroître leur spécificité, leur stabilité et leur activité catalytique. Toutefois, ces modifications chimiques peuvent induire un changement dans la conformation tridimensionnelle du ribozyme, laquelle est primordiale pour leur activité enzymatique. Les ribozymes possèdent une vitesse catalytique très lente ce qui limite leur efficacité dans un contexte thérapeutique.

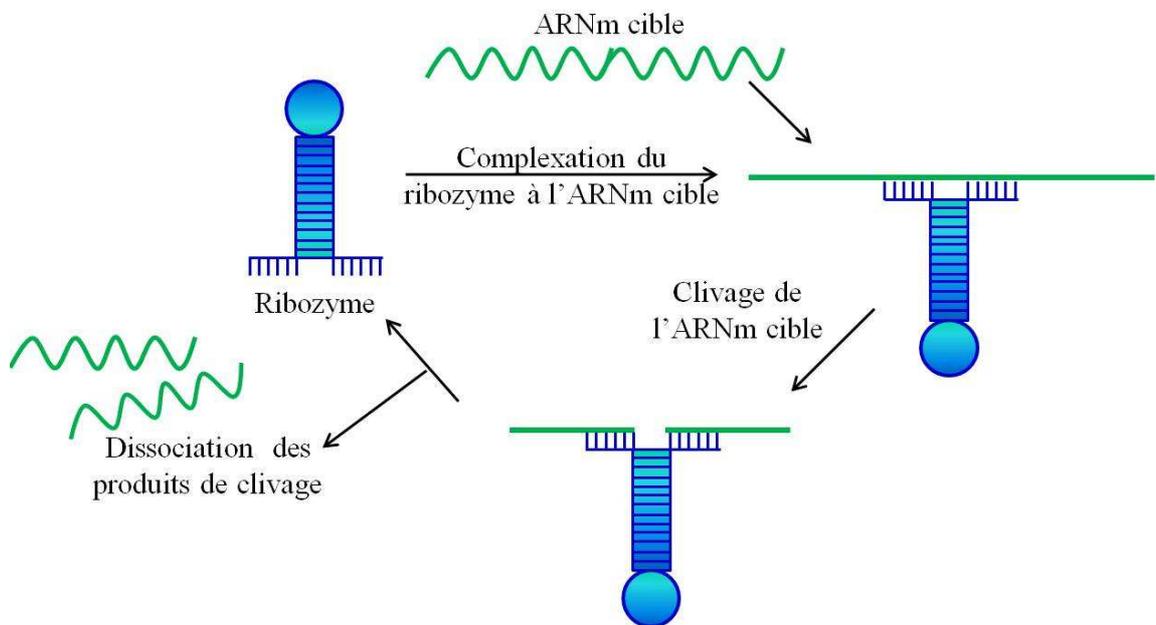


Figure 1.1. Représentation schématique du mécanisme d'action des ribozymes à tête marteau. Schéma adapté de Sullenger *et al.* (2002).

À ce jour, trois formulations de ribozymes à tête marteau ont atteint les phases cliniques I et II (<http://clinicaltrials.gov>) : l'Angiozyme^(MC) (Ribozyme Pharmaceuticals), OZ1^(MC) (Johnson & Johnson Pharmaceutical) et l'Heptazyme^(MC) (Ribozyme Pharmaceuticals). Le premier consiste en une formulation dirigée contre le pré-ARN du

récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et permet d'inhiber la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les cas du cancer colorectal (Wright et Kearney 2001). L'OZ1^(MC) est un ribozyme contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui cible les cellules souches hématopoïétiques (CD34+) et les lymphocytes T (CD4+) (Mitsuyasu *et al.* 2009). Ces deux systèmes ont complété leur phase clinique II. L'Heptazyme^(MC), pour sa part, peut cliver sélectivement le ribosome du virus de l'hépatite C. Son efficacité à bloquer la réplication virale (~ 90%) a été démontrée *in vitro* (Kurreck 2003). Toutefois, malgré qu'une réduction significative de la synthèse de l'ARN codant pour le virus de l'hépatite C a été obtenue chez certains patients lors d'une étude de phase II, les essais cliniques ont été suspendus puisqu'une toxicité positive a été rapportée chez l'animal. Les études cliniques n'ont toujours pas été complétées à ce jour.

1.2. Les ONs antisens

Les ONs antisens sont de simples brins d'ADN constitués de 8 à 21 nucléotides (Vidal *et al.* 2005). Leur potentiel antisens a été démontré pour la première fois en 1978 par Zamecnik et Stephenson, à la suite de l'inhibition de la réplication virale de cellules infectées par le virus du sarcome de Rous (Zamecnik et Stephenson 1978, Kurreck 2003). Les ONs antisens sont capables de s'associer spécifiquement à une séquence cible de l'ARNm par des liaisons de Watson-Crick afin de former un duplex entre l'ON antisens et l'ARNm cible. Les mécanismes d'action par lesquels les ONs antisens induisent leur effet biologique sont complexes et, à ce jour, encore mal définis. Parmi les mécanismes d'action suggérés, l'hybridation de l'ON peut mener à l'arrêt de la traduction de l'ARNm cible par blocage stérique ou à la dégradation du brin ARN par recrutement de la RNase H (figure 1.2) (Dias et Stein 2002, Kurreck 2003).

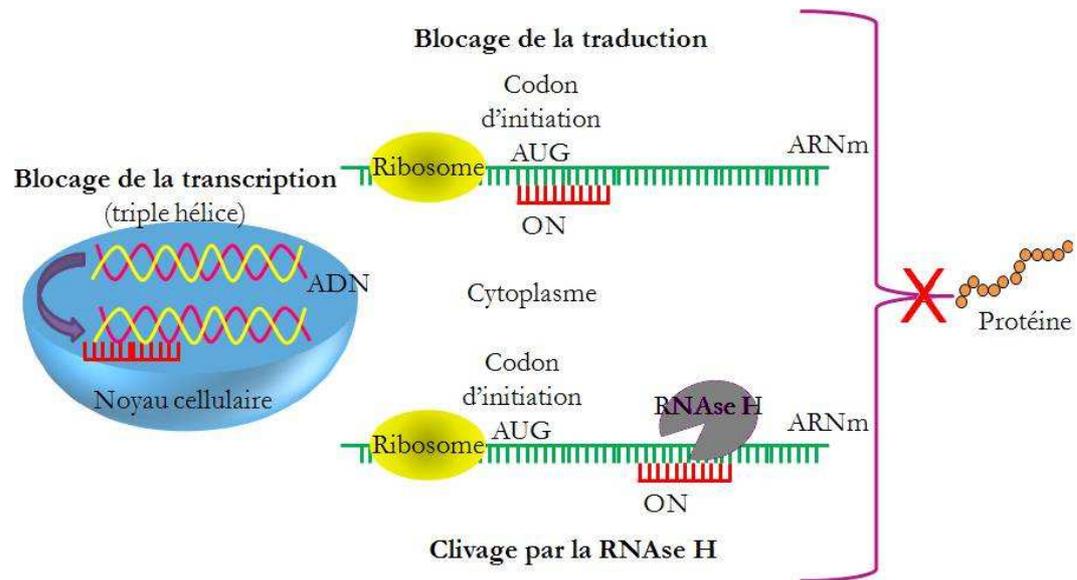


Figure 1.2. Représentation schématique des mécanismes d'action possibles des ONs. Schéma adapté de Lambert *et al.* (2001).

Le blocage stérique par les ONs antisens peut intervenir à diverses étapes de la machinerie traductionnelle (initiation, élongation et traduction) (figure 1.2). Par exemple, certains ONs antisens peuvent obstruer physiquement l'assemblage du ribosome perturbant ainsi la traduction de l'ARNm en protéine (Crooke 1999). Certains ONs antisens peuvent également former une structure en triple hélice (TFO; *triplex forming oligonucleotides*) avec un double brin d'ADN et bloquer stériquement le site d'initiation de la transcription de l'ADN en pré-ARNm ou bien intervenir à l'étape d'épissage, *i.e.* en empêchant le processus d'excision des introns, inhibant ainsi la formation d'un ARNm mature. En plus de l'appariement Watson-Crick, la TFO résulte en la formation de ponts hydrogènes de types Hoogsteen entre les pyrimidines de l'ON et les purines des brins de l'ADN double brin (Praseuth *et al.* 1999).

La majorité des ONs antisens font appel au recrutement d'une ribonucléase, la RNase H, afin de déclencher la dégradation de l'ARN et de diminuer l'expression

génétiq ue (Dias et Stein 2002). Cette ribonucléase est une enzyme ubiquitaire, située dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule, qui hydrolyse spécifiquement le brin d'ARNm dans le duplex ON/ARNm. Une fois introduit dans la cellule, l'ON antisens s'hybride à l'ARNm par appariement de Watson-Crick, ce qui donne lieu à une structure en double hélice et permet le recrutement de l'enzyme (Aboul-Fadl 2005). Alors que les ONs antisens qui agissent par blocage stérique ne peuvent cibler spécifiquement que la région 5' ou la région du codon initiateur AUG, les ONs antisens dépendant de la RNase H peuvent cibler n'importe quelle région de l'ARNm, ce qui leur confère une meilleure efficacité. En effet, l'efficacité d'inhibition de l'expression d'un gène par la RNase H varie de 80 à 95% (Dias et Stein 2002).

1.3. Les ARNis

Les ARNis sont à la base d'un mécanisme de défense naturelle et seraient impliqués, entre autres, dans la régulation des ARNm, les mécanismes de défense antiviraux et la méthylation de l'ADN (Scholzova *et al.* 2007). Les ARNis sont des doubles brins d'ARN qui interviennent au niveau post-transcriptionnel et participent à l'activation de la machinerie de l'épissage, *i.e.* l'excision des séquences introniques, ce qui mène à l'inhibition d'un gène d'une manière séquence-spécifique.

La présence dans le cytoplasme d'ARNis entraîne leur reconnaissance par une enzyme de la famille des ribonucléases, la ribonucléase III (DICER), qui les dégrade en petits segments de 21 à 23 bases nucléotides appelés petits ARN interférants (pARNis; *small interfering RNAs*) (Kurreck 2003). Ces fragments sont par la suite incorporés dans un complexe ribonucléoprotéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) où ils seront déroulés puis séparés en antisens simples brins par les protéines hélicases du complexe (Zamore 2001, Kurreck 2003, Aboul-Fadl 2005). L'antisens simple brin sert alors de guide au complexe RISC afin de cliver sélectivement le brin d'ARNm cible de la séquence

complémentaire (figure 1.3). Le potentiel thérapeutique des pARNis a été démontré pour la première fois en 2001, suite à l'inhibition spécifique de gènes codant pour la luciférase dans différentes lignées cellulaires de mammifères (Elbashir *et al.* 2001). En thérapie génique, la stratégie consiste à introduire dans les cellules des pARNis ciblés spécifiquement envers l'ARNm d'intérêt, ce qui permet d'éviter l'étape de clivage par l'enzyme DICER et d'activer directement le complexe RISC menant à la dégradation de l'ARNm cible et bloquant ainsi la synthèse de la protéine défectueuse (Hannon 2002, Manoharan 2004). De plus, l'activation de la réaction inflammatoire causée par de longs ARNis est ainsi évitée. Il a été montré que le potentiel d'inhibition de l'ARNm par un pARNis est près de 10 fois supérieur à celui d'un ARN simple brin ou d'un ARN antisens, probablement grâce aux propriétés catalytiques du complexe RISC (Hannon 2002).

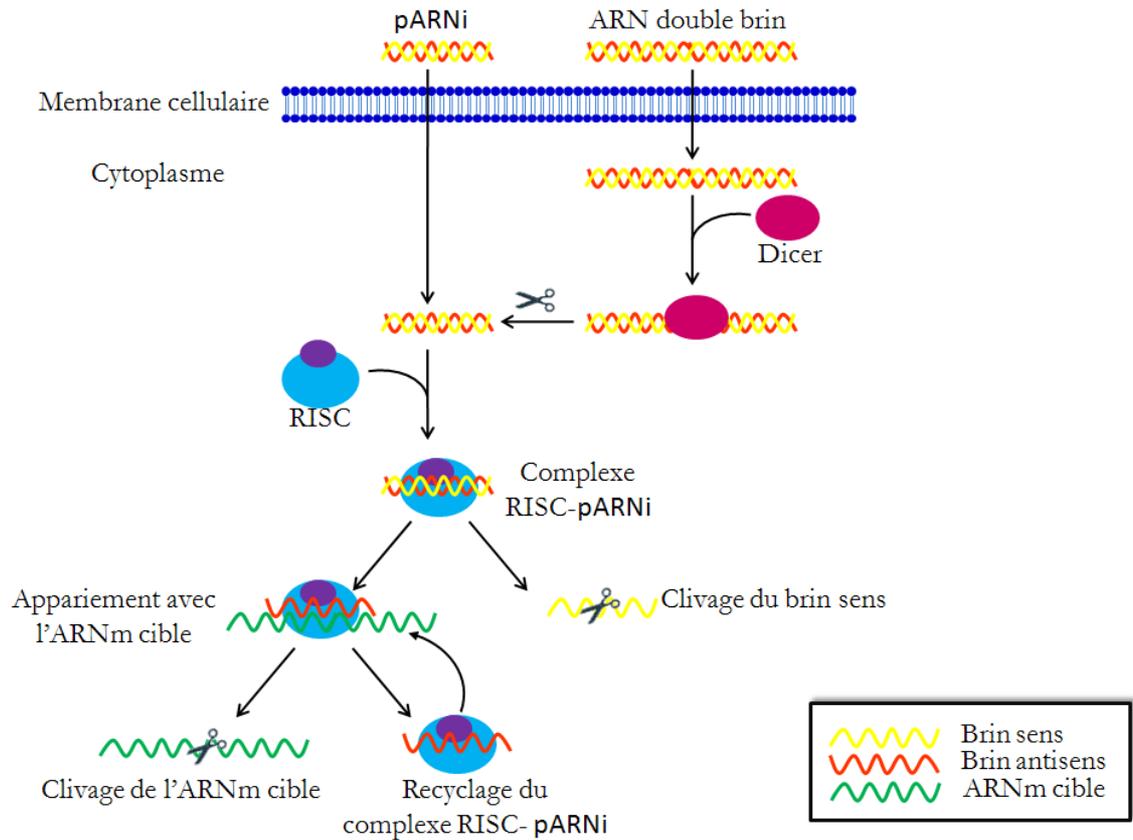


Figure 1.3. Représentation schématique du mécanisme d'action des ARNi et des pARNi pour l'inhibition de la synthèse protéique. Schéma adapté de Whitehead *et al.* (2009).

2. LES MODIFICATIONS CHIMIQUES DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

Depuis le début des années 90, plusieurs modifications chimiques ont été apportées aux ribozymes, aux pARNi ainsi qu'aux ONs afin d'augmenter leur efficacité, leur solubilité et leur stabilité dans le compartiment sanguin. En effet, l'utilisation des ONs *in vivo* présente de sérieux inconvénients. Par exemple, la liaison phosphodiester des ONs natifs

les rendent plus vulnérables à une dégradation enzymatique dans les milieux biologiques ce qui limite leur durée de vie *in vivo*. La demi-vie de ces derniers en présence de sérum humain serait de l'ordre de 90 minutes (Kurreck 2002). Ainsi, ces modifications visent essentiellement à accroître leur résistance face aux nucléases, des enzymes qui dégradent les acides nucléiques en leurs bases nucléotides respectives. Le développement d'acides nucléiques modifiés chimiquement est un processus complexe qui est surtout appliqué aux acides nucléiques courts, tel que les ONs. La section suivante met donc l'emphase sur les modifications apportées aux ONs.

2.1. Les oligonucléotides de première génération

Les ONs phosphorothioates (ONs-PS) découlent de la substitution d'un atome d'oxygène de leur groupement phosphate par un atome de soufre (figure 1.4). Les ONs-PS demeurent la génération d'ON la plus couramment utilisée en recherche et dans les études cliniques (Eckstein 2000). L'introduction d'un atome de soufre permet d'accroître la résistance des ONs face aux nucléases et de prolonger leur temps de demi-vie dans la circulation sanguine (Aboul-Fadl 2005). En effet, les ONs-PS ont une plus grande stabilité dans les milieux biologiques et leur temps de demi-vie dans le sérum humain est près de 10 fois supérieur à celui des ONs natifs (Kurreck 2003, Aboul-Fadl 2005). Les ONs-PS maintiennent leur capacité à se lier de manière spécifique à l'ARNm cible et à recruter la RNase H (Pirollo *et al.* 2003). Toutefois, la présence du groupement phosphorothioate diminue la stabilité du complexe formé, ce qui se traduit par une diminution du point de fusion des duplexes d'approximativement 0,5°C par base nucléotide (Kurreck 2003, Pirollo *et al.* 2003). Cette température se définit comme étant la température à laquelle 50% des duplexes sont dissociés. Par ailleurs, les ONs-PS ont la particularité d'interagir de manière non spécifique avec diverses protéines conduisant ainsi à des effets non spécifiques de la séquence. Ce manque de spécificité peut provoquer plusieurs effets non désirés, tels que l'activation du système du complément et une importante toxicité cellulaire lorsque l'ON-

PS interagit avec des protéines impliquées dans l'activité métabolique des cellules (Pirollo *et al.* 2003). Ces effets secondaires peuvent facilement être confondus avec l'effet thérapeutique antisens.

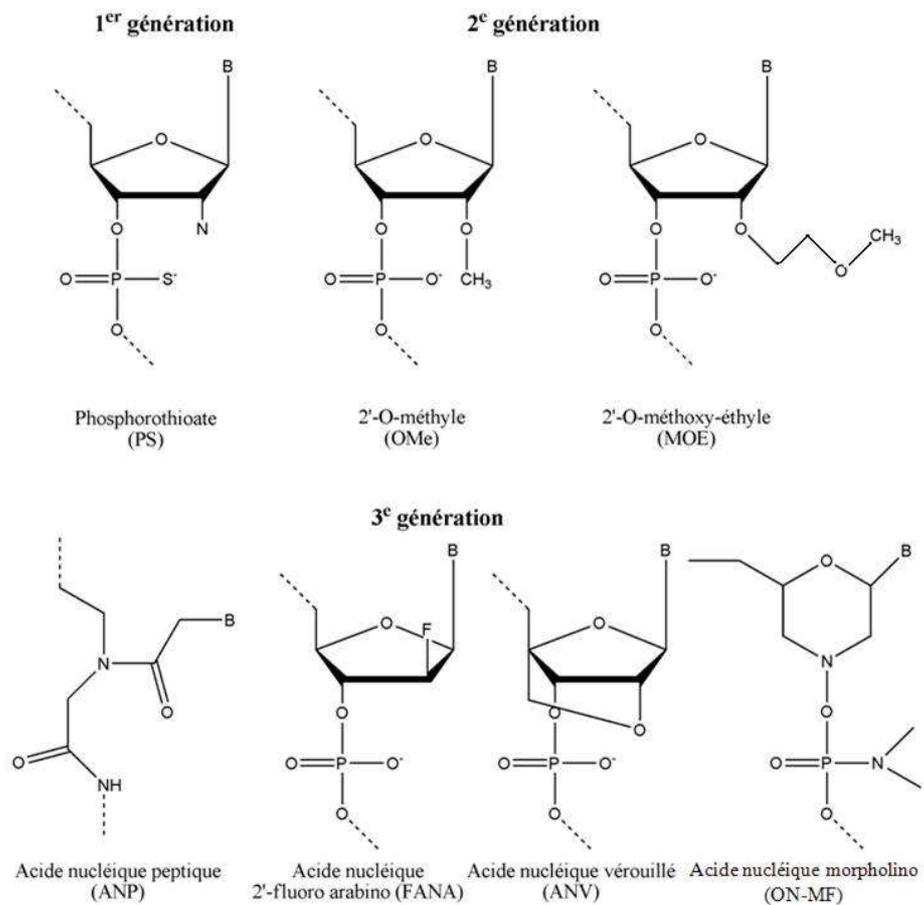


Figure 1.4. Représentation des dérivés d'acides nucléiques de première, deuxième et troisième générations.

2.2. Les oligonucléotides de deuxième génération

La deuxième génération d'ONs est principalement constituée des 2'-O-méthyle (OMe) et 2'-O-méthoxy-éthyle (MOE) (figure 1.4). Sur ces derniers, l'atome d'oxygène en deuxième position du ribose est alkylé (ON 2'-alkyle), ce qui permet d'accroître la stabilité des duplexes ON/ARNm, d'améliorer davantage la résistance aux nucléases et de diminuer la toxicité non spécifique rencontrée chez les ONs-PS. Les ONs 2'-alkyle ont été testés *in vitro* et *in vivo* et ont fait l'objet de quelques études cliniques (Pirollo *et al.* 2003). Cependant, l'encombrement stérique créé par l'alkylation du ribose empêche le recrutement de la RNase H (Lok *et al.* 2002). En effet, l'activation de la RNase H dépend essentiellement de la structure tridimensionnelle adoptée par le duplex ON/ARNm, de la flexibilité de l'ON, ainsi que de la stéréochimie du ribose en position 2' (Aboul-Fadl 2005). Plus particulièrement, il a été démontré que la stéréochimie locale de l'hydroxyle en position 2' du brin d'ARN, projeté dans le sillon mineur du duplex ON/ARNm, serait un élément clé dans l'activité catalytique de la RNase H. Cette stéréochimie locale est facilement perturbée par l'introduction de modifications au niveau des riboses de l'ON ou de son squelette (Zamaratski *et al.* 2001). Conséquemment, le mécanisme d'action de cette classe d'ON repose essentiellement sur un blocage stérique au niveau de la traduction de l'ARNm ou de l'étape d'épissage du pré-ARNm (Kurreck 2003).

2.3. Les oligonucléotides de troisième génération

Les composés de troisième génération présentent des modifications au niveau du lien phosphate et/ou du sucre et visent à augmenter l'affinité d'hybridation des ONs et leur spécificité envers leur cible. La librairie d'analogues d'ONs de troisième génération est particulièrement variée (Kurreck 2003, Aboul-Fadl 2005). Les plus prometteurs font partie de la classe des acides nucléiques peptidiques (ANPs), les ONs morpholino (ONs-MF) et des acides nucléiques verrouillés (ANVs) (figure 1.4) (Kawakami *et al.* 2008). Toutefois, à l'exception des dérivés d'acide nucléique 2'-fluoro-arabino (FANA), les ONs de troisième

génération ne peuvent pas recruter la RNase H (Kurreck 2003) et donc l'inhibition de la synthèse protéique se fait exclusivement *via* un mécanisme d'encombrement stérique lors de la traduction de l'ARNm.

Les FANAs (figure 1.4) sont les premiers ONs de troisième génération qui présentent à la fois une grande affinité pour l'ARNm et une résistance accrue aux nucléases. Ils sollicitent également l'hydrolyse du brin d'ARNm par le recrutement de la RNase H (Damha *et al.* 1998, Lok *et al.* 2002). Le FANA est un 2'-stéréo-isomère de l'ARN dans lequel le groupement hydroxyle en position 2' a été substitué par un atome de fluor (Kalota *et al.* 2006). L'atome de fluor, projeté dans le sillon majeur du duplex FANA/ARNm, ne modifie pas la structure tridimensionnelle de ce dernier ce qui lui permet de conserver sa capacité à recruter la RNase H (Damha *et al.* 1998, Kurreck 2003). Par ailleurs, il a été démontré que le point de fusion du duplex FANA/ARNm est augmenté de près de 1,5°C par nucléotide comparativement au duplex analogue d'ON/ARNm (Kalota *et al.* 2006), ce qui confirme que la présence de l'atome de fluor favorise l'hybridation du FANA avec l'ARNm complémentaire.

2.4. Les essais cliniques

Depuis les premiers essais cliniques de la thérapie génique en 1989, près de 1500 essais cliniques ont été réalisés. Environ 65% des essais menés en 2009 visaient le traitement du cancer, contre ~ 7% pour les maladies monogéniques (figure 1.5). À ce jour, la plupart des études cliniques visent à tester des ONs-PS. Toutefois, quelques ONs de deuxième et troisième générations ont atteint les phases cliniques (Kurreck 2003). Par exemple, l'ON genasens (Genta, USA) qui cible la protéine Bcl-2 pour les mélanomes métastatiques est présentement en étude de phase III. Le Vitravene^(MC) (Formivirsén sodium) (Isis Pharmaceuticals, USA), récemment retiré du marché, demeure à ce jour le seul ON-PS à avoir été approuvé par les autorités gouvernementales pour son utilisation

chez l'homme et a avoir été commercialisé dans plusieurs pays. Cet ON-PS thérapeutique visait le traitement du *Cytomegalovirus retinis*, une infection virale retrouvée chez les patients atteints du VIH (Wilds et Damha 2000, Hughes *et al.* 2001).

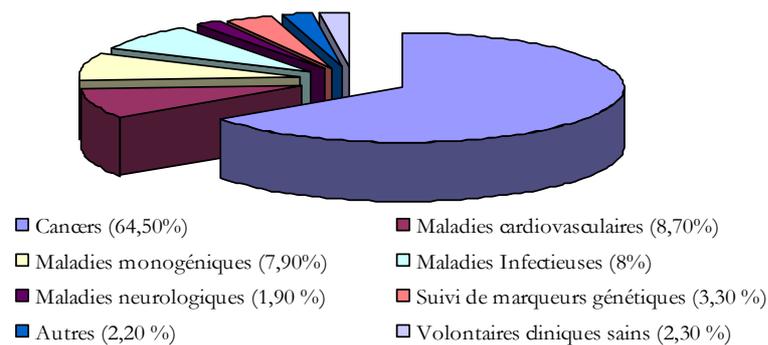


Figure 1.5. Pathologies étudiées en thérapie génique. Le pourcentage correspond aux protocoles d'essais cliniques menés en 2009 pour chacun des domaines (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>).

3. L'ADMINISTRATION DE GÈNES

L'administration de gènes chez l'humain peut se faire par deux approches, soit une administration « *ex vivo* » ou « *in vivo* ». L'approche *ex vivo* implique le prélèvement de cellules de patient, leur traitement par transfert de gènes *in vitro* puis leur réinjection chez le patient. L'approche *in vivo*, pour sa part, implique une administration directe du matériel génétique au patient. Quelle que soit l'approche utilisée, le transport du gène dans les cellules cibles est l'un des principaux défis inhérents à la thérapie génique. Diverses méthodes d'administration ont été développées afin de livrer efficacement le matériel génétique aux cellules cibles, incluant des méthodes physiques ou l'utilisation de vecteurs viraux ou synthétiques. Les principaux vecteurs de transfert de gènes utilisés dans des essais cliniques sont présentés à la figure 1.6.

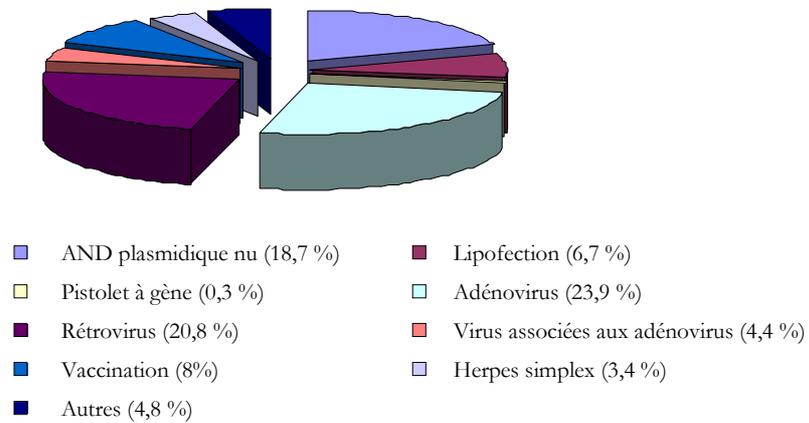


Figure 1.6. Principales vecteurs de transfert de gènes utilisées en thérapie génique. Le pourcentage correspond aux protocoles d'essais cliniques menés en 2009 pour chacun des domaines (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>).

3.1. Les méthodes physiques

Depuis le succès de l'injection locale d'ADN plasmidique nu dans les muscles striés d'une souris (Wolff *et al.* 1990), plusieurs méthodes d'administration physique ont été développées. Elles sont présentées dans le tableau 1.1. De manière générale, ces méthodes d'administration permettent de concentrer le matériel génétique au niveau de la cible, ce qui diminue les effets secondaires liés à une distribution non spécifique du matériel génétique. Toutefois, certaines méthodes (*e.g.* pistolet à gènes, électroporation ou sonoporation) sont généralement limitées à des applications locales (*e.g.* topique, musculaire) ou nécessitent une infrastructure coûteuse (par exemple pour la microinjection ou l'utilisation de laser).

Tableau 1.1. Administration des gènes d'intérêt par méthodes physiques

Techniques	Principes	Avantages	Inconvénients	Références
Microinjection (<i>ex vivo</i>)	Injection directe dans le noyau	- Très efficace (ciblage direct du noyau)	- Technique laborieuse - Difficilement applicable <i>in vivo</i>	Gao 2007; Gordon 1980
Pistolet à gène (biolistique)	Bombardement de particules métalliques à très grande vitesse	- Peu immunogénique	- Faible profondeur de pénétration des particules dans les tissus	Gao 2007
Électroporation	Perméabilisation ponctuelle de la membrane cellulaire sous l'application d'un champ électrique	- Très efficace	- Application locale seulement	Nisgikawa 2002; Neumann 1982
Ultrason	Perturbation physique au niveau de la membrane induite par l'application d'ultrasons et la formation de microbulles	- Efficace	- Application locale - Faible taux de transfection	Gao 2007; Dautry 2004; Deng 2004
Laser	Perméabilisation transitoire de la membrane cellulaire induite par une irradiation au laser	- Efficace	- Coût élevé	Kawakami 2008

3.2. La vectorisation

L'administration systémique est l'approche la plus intéressante pour l'administration d'acides nucléiques (*vs* locale, orale, transdermique ou pulmonaire) puisque le produit injecté bénéficie directement du réseau vasculaire et se distribue dans tout l'organisme, ayant ainsi accès à tous les organes et les tissus pathologiques. Toutefois, afin d'atteindre son site d'action, le matériel génétique doit surmonter plusieurs barrières

physicochimiques. En effet, à la suite de son administration intraveineuse, il se retrouve rapidement exposé aux différentes composantes de la circulation sanguine (*e.g.* les nucléases, les protéines du système du complément et les cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM)) ce qui conduit à son élimination prématurée de la circulation sanguine (Niidome et Huang 2002). Par ailleurs, le manque de spécificité du matériel génétique peut induire une toxicité au niveau des cellules saines du foie, des poumons et/ou des reins, où le matériel s'accumule préférentiellement par l'entremise d'interactions non spécifiques (Vasir *et al.* 2005). Finalement, la fraction de matériel génétique qui parvient à atteindre sa cible et à être internalisée par endocytose se retrouve alors séquestrée dans le compartiment endosomal/lysosomal, lequel conduira ultimement à sa dégradation.

Bien que les modifications chimiques apportées aux matériels génétiques aient permis d'accroître leur résistance aux nucléases, leurs propriétés physicochimiques (taille, hydrophilie et nature anionique) rendent leur passage à travers la membrane cellulaire difficile. La vectorisation vise à moduler les propriétés intrinsèques d'un principe actif, tel que les ONs, en l'associant à un système de transport. Cette approche permet donc de surmonter plusieurs des inconvénients rencontrés lors de l'administration du matériel génétique « nu ». Le vecteur doit idéalement:

- Être non-toxique, biocompatible et biodégradable ;
- Être furtif (faible ou non immunogénique) ;
- Protéger le matériel génétique contre les diverses composantes du système sanguin ;
- Posséder un mécanisme de déstabilisation afin de libérer son contenu dans le cytoplasme de la cellule.

Les vecteurs employés en thérapie génique peuvent être regroupés sous deux grandes catégories, soit les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques.

3.3. Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont très intéressants pour l'administration de matériel génétique puisqu'ils peuvent infecter les cellules cibles, exploiter leur machinerie cellulaire afin de se répliquer et ainsi reprogrammer le patrimoine génétique de la cellule hôte. Afin d'utiliser les virus en tant que vecteurs, les composantes protéiques qui assurent la transfection du virus (*e.g.* capsid, protéine de l'enveloppe, protéine fusogène, empaquetage, expression du gène) (Thomas *et al.* 2003, Mastrobattista *et al.* 2006) sont conservées alors que celles associées à la réplication virale et à leur caractère pathogène sont éliminés (Kay *et al.* 2001). Le génome viral est reconstruit pour porter les séquences du gène d'intérêt. Les vecteurs viraux sont classés selon leur capacité à intégrer leur patrimoine génétique à celui de la cellule hôte (rétrovirus et lentivirus) ou non (adénovirus et virus associés aux adénovirus) (tableau 1.2). Bien que l'intégration chromosomique assure une expression permanente du transgène, les rétrovirus et les lentivirus ne peuvent qu'infecter les cellules en division. Les adénovirus et virus associés aux adénovirus, quant à eux, procurent une expression transitoire du transgène et sont donc peu efficaces pour apporter un changement génétique stable.

Tableau 1.2. Propriétés des différents vecteurs viraux utilisés en thérapie génique. Tableau adapté de Li et al. (2006) et de Thomas *et al.* (2003).

Vecteurs	Matériel génétique (taille encapsulée)	Intégration dans le génome	Avantages	Inconvénients
Rétrovirus	ARN (< 8 Kb)	oui	- Faible immunogénicité - Expression à long terme	- Intégration lors de la mitose - Risque de mutagénicité - Insertion aléatoire
Lentivirus	ARN (< 8 Kb)	oui	- Faible immunogénicité - Infection des cellules quiescentes et en division - Expression à long terme	- Risque de mutagénicité - Insertion aléatoire
Adénovirus	ADN (< 8 Kb)	non	- Faible risque de mutagénicité - Non pathogène	- Immunogénicité - Expression transitoire du transgène
Virus associés aux adénovirus	ADN (< 5 Kb)	Épisomal (>90%) Intégré (<10%)	- Faible immunogénicité - Durée d'expression > 1 an	- Capacité d'insertion limitée
Virus Herpes simplex	ADN (< 40 Kb)	non	- Grande capacité d'insertion - Neurotropisme - Durée d'expression > 1 an	- Immunogénicité - Toxicité - Expression transitoire du transgène

Bien que certains vecteurs viraux aient montré une haute spécificité et efficacité de transfection, leur utilisation demeure limitée par des inconvénients majeurs. En effet, certains vecteurs viraux peuvent engendrer une forte réaction immunitaire, redevenir pathogènes après une mutation ou générer une importante toxicité cellulaire (Thomas *et al.* 2003, Mastrobattista *et al.* 2006). En 1999, un patient est décédé d'une forte réaction inflammatoire suite à l'administration d'adénovirus (Thomas *et al.* 2003). Quelques années plus tard, en 2002, l'équipe d'Alain Fisher a rapporté le développement de leucémies chez trois enfants atteints du syndrome de déficience immunitaire sévère ayant suivi, quelques

années auparavant, une thérapie génique par rétrovirus (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2003). Cette mutagénicité du virus a été induite par une insertion aléatoire du transgène dans le génome de la cellule hôte. Ces effets secondaires ont grandement freiné le développement clinique des vecteurs viraux et ont incité les chercheurs à développer des vecteurs non viraux plus sécuritaires. Comme alternative aux vecteurs viraux, les cellules bactériennes ont gagné de plus en plus d'intérêt au cours des dernières années. Les minicellules (100-400 nm) sont des cellules bactériennes dont les cellules filles sont dépourvues de leur ADN chromosomique. Ces dernières présentent donc moins de risque de mutagénicité que les vecteurs viraux (Giacalone *et al.* 2006). MacDiarmid *et al.* (2009) ont récemment rapporté l'utilisation de minicellules comme vecteur de transfection des pARNis ainsi que de molécules cytotoxiques. Chaque minicellule peut contenir plus de 12 000 molécules de pARNi comparativement à des anticorps ou aptamères qui ne peuvent transporter que 10 et 2000 molécules de pARNi, respectivement (MacDiarmid *et al.* 2009, Song *et al.* 2005, McNamara *et al.* 2006)

3.4. Les vecteurs synthétiques

Face aux inconvénients des vecteurs viraux, les vecteurs synthétiques présentent une alternative, en théorie, plus sécuritaire. Ces derniers sont également plus faciles à préparer et à manipuler que les vecteurs viraux. Une très grande variété de vecteurs synthétiques ont été développés. La section suivante portera plus particulièrement sur les liposomes, les nanoparticules, les micelles polymères ainsi que leurs complexes respectifs avec le matériel génétique.

3.4.1.1. Les vecteurs lipidiques : les liposomes et les lipoplexes

Les liposomes sont des vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques organisées entre deux compartiments aqueux (Bangham *et al.* 1965) et qui présentent une taille variant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres. Leur auto-assemblage en bicouches est induit par les interactions polaires entre les têtes

hydrophiles, dirigées vers l'extérieur, et les interactions hydrophobes entre les chaînes lipidiques (Bangham *et al.* 1965) (figure 1.7 a). Les liposomes permettent la solubilisation de molécules de lipophilie variable, soit au niveau de la bichouche phospholipidique (molécules hydrophobes), à l'interface de celle-ci ou dans le compartiment aqueux (molécules hydrophiles) (Torchilin 2005). L'incorporation de matériel génétique au sein des vecteurs lipidiques est favorisée par l'utilisation de lipides chargés positivement. Le complexe qui en résulte est désigné sous le terme de lipoplexe et sa formation est essentiellement guidée par des interactions électrostatiques entre les têtes cationiques du lipide et les groupements phosphate de l'acide nucléique (figure 1.7 b).

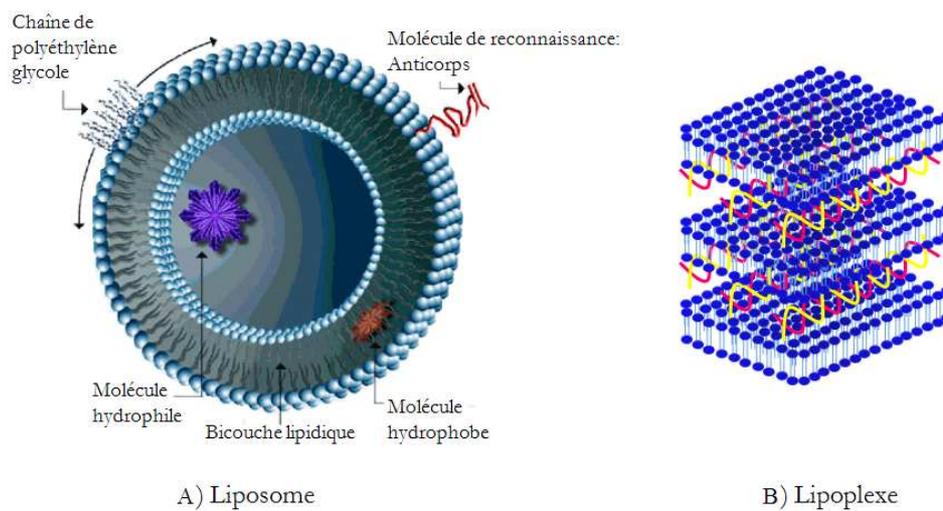


Figure 1.7. Représentation schématique de la structure d'un liposome (A) et d'un lipoplexe (B). Schéma adapté de Safinya (2001).

Les lipides cationiques sont généralement composés de trois parties : 1) une ancre hydrophobe, qui peut être aussi bien une ou plusieurs chaînes lipidiques qu'un groupement cholestérol, 2) un bras espaceur et 3) une tête cationique, qui peut être mono- ou multi-chargée. Le chlorure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium (DOTMA), synthétisé par le groupe de P. Felgner (1997), fut le premier lipide cationique qui démontra une activité de transfection. Depuis, une vaste librairie de lipides cationiques a été développée et de

nombreux essais cliniques ont été effectués (Barron *et al.* 1999). Outre le DOTMA, les lipides cationiques les plus souvent utilisés sont le dioléoyl-triméthylammonium propane (DOTAP), le trifluoroacétate de dioléoxy [(spermine-carboxyamido) éthyl] diméthylpropanaminium (DOSPA) et l'acide trifluoroacétique diotadécylamidoglycylspermine (DOGS) (figure 1.8) (Mintzer et Simanek 2009). Les lipides cationiques multivalents, tels que le dioléoyl-oxypropyldiméthylammonium amidospermine (DOSPA) et le dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS), ont été développés sous le principe qu'un plus grand nombre de charges positives sur le lipide cationique permettrait une meilleure interaction avec le matériel génétique. Wheeler *et al.* (1996) ont ainsi démontré que l'augmentation de la densité de charges du lipide cationique renforce les interactions avec l'acide nucléique et améliore l'efficacité de transfection du vecteur.

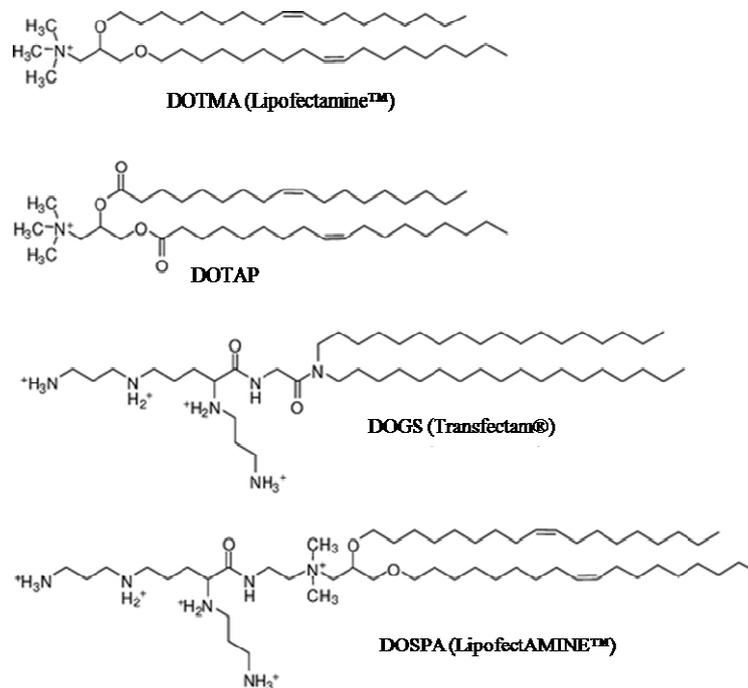


Figure 1.8. Structures des principaux lipides cationiques utilisés dans la préparation des lipoplexes.

L'entrée des lipoplexes dans la cellule fait principalement intervenir des interactions électrostatiques entre le lipoplexe chargé positivement et la membrane cellulaire chargée négativement. Les mécanismes d'internalisation des lipoplexes sont encore mal connus mais deux hypothèses dominent. L'hypothèse principale est la voie de l'endocytose (Harashima *et al.* 2001, Bertin *et al.* 2007, Resina *et al.* 2009) alors que la seconde suggère que les lipoplexes fusionnent directement avec la membrane plasmique, libérant ainsi sa cargaison dans le cytoplasme de la cellule (Felgner *et al.* 1987, Ulrich 2002, Resina *et al.* 2009). Le mécanisme d'entrée dans la cellule influence le trafic intracellulaire et le temps de demi-vie du matériel génétique. Dans le cas de l'endocytose, les lipoplexes se retrouvent confinés dans le compartiment endosomal et ultimement dans des lysosomes où ils seront dégradés. La charge positive des lipoplexes peut toutefois contribuer à la déstabilisation de la membrane endosomale et à la libération du matériel génétique vers le cytoplasme de la cellule. Szoka *et al.* (1996) ont proposé un mécanisme de «flip-flop» entre les lipides cationiques et les lipides anioniques de la paroi cytoplasmique (figure 1.9). Selon les auteurs, les lipides cationiques induiraient une inversion des lipides anioniques de la membrane cytoplasmique. Ces derniers diffuseraient ensuite dans le complexe et induiraient la neutralisation des lipides cationiques et le déplacement de l'ON, lequel serait alors libéré dans le cytoplasme. En marge de ce mécanisme de «flip-flop», l'incorporation d'un lipide auxiliaire neutre (co-lipide) et fusogène, tel que le dioléoylphosphatidyl éthanolamine (DOPE), permettrait d'induire une déstabilisation de la membrane endosomale et de favoriser le relargage du matériel génétique dans le cytoplasme une fois ses propriétés fusogènes activées par l'acidification de l'endosome (Zubin *et al.* 1999, Weyermann *et al.* 2004, Bertin *et al.* 2007, Gao *et al.* 2007). Plus particulièrement, la formulation DOSPA:DOPE, commercialisée sous le nom de Lipofectamine^(MC), est à ce jour la formulation la plus utilisée pour la transfection *in vitro*.

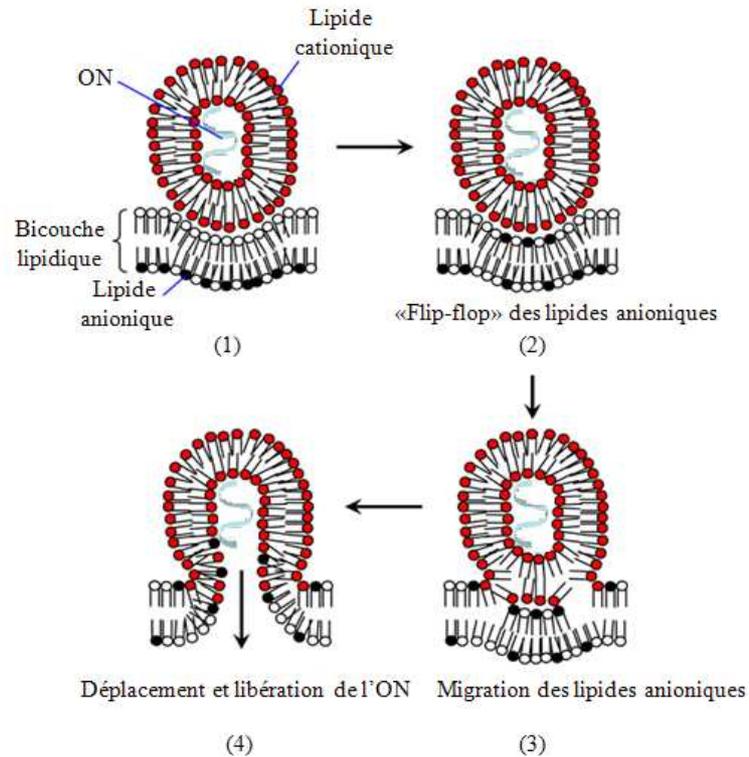


Figure 1.9. Mécanisme de «flip-flop». Schéma adapté de Medina-Kauwe *et al.* (2005).

Par ailleurs, afin d'augmenter le temps de rétention des liposomes et des lipoplexes dans la circulation sanguine, les complexes peuvent être décorés d'une couronne de polymère neutre hydrophile. À cette fin, un dérivé lipidique conjugué à une chaîne de PEG est fréquemment ajouté lors de la formulation du vecteur. Le PEG est reconnu pour réduire les interactions non spécifiques, masquer la charge apparente du vecteur (dans le cas d'un vecteur chargé) et également réduire la reconnaissance du vecteur par le système immunitaire, ce qui contribue globalement à augmenter le temps de circulation systémique de ce dernier. Toutefois, la présence de ce polymère inhibe les interactions avec les cellules et réduit l'efficacité de transfection du système. Il est possible de coupler une molécule de reconnaissance à la surface du vecteur afin d'accroître leur spécificité et favoriser leur internalisation par les cellules cibles (Moghimi *et al.* 2001). Par exemple, Shi *et al.* (2000)

ont mis au point des immunoliposomes PEGylés ciblés (~100 nm) pour le transport d'ADN plasmidique au niveau du cerveau. La conjugaison de chaînes de PEG de 2 KDa à la surface du vecteur a permis, en plus de minimiser la reconnaissance du vecteur par le SPM et d'éviter une élimination prématurée du vecteur de la circulation, d'introduire un site potentiel pour la conjugaison d'une molécule de reconnaissance à la surface du vecteur. L'ajout à la surface de ces liposomes neutres d'un anticorps spécifique, tel qu'un anticorps dirigé contre les récepteurs à l'insuline, a permis aux liposomes de passer la barrière hématoencéphalique et s'est traduit par l'expression spécifique du gène de luciférase au niveau des cellules du cerveau.

Depuis leur introduction en tant que vecteurs de gène en 1987, les vecteurs lipidiques sont devenus des systèmes largement étudiés. L'utilisation de ces vecteurs représente actuellement environ 6 % des essais cliniques de thérapie génique (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>). Cependant, malgré leur succès *in vitro*, leur faible efficacité *in vivo*, leurs interactions non-spécifiques avec des protéines plasmatiques ainsi que la toxicité associée aux lipides cationiques limitent leur utilisation en thérapie génique.

3.4.1.2. Les vecteurs polymères

3.4.1.2.1. Les nanoparticules

Les nanoparticules (NPs) sont des systèmes colloïdaux polymères (< 1 µm) dans lesquels l'agent thérapeutique est incorporé de manière physique. Les nanoparticules peuvent être produites par plusieurs méthodes non spécifiques, telles que la co-précipitation, la dispersion moléculaire, l'adsorption ou la conjugaison du produit actif à la surface de la matrice (Lambert *et al.* 2001, Vasir *et al.* 2005). Selon la méthode de préparation, des nanocapsules ou des nanosphères peuvent être obtenues (figure 1.10). Les nanocapsules sont des vésicules dans lesquelles le produit actif est confiné dans une cavité

aqueuse ou lipidique entourée d'une capsule polymère, tandis que les nanosphères sont des systèmes matriciels dans lesquels le produit actif est dispersé à travers la matrice polymère (Lambert *et al.* 2001).

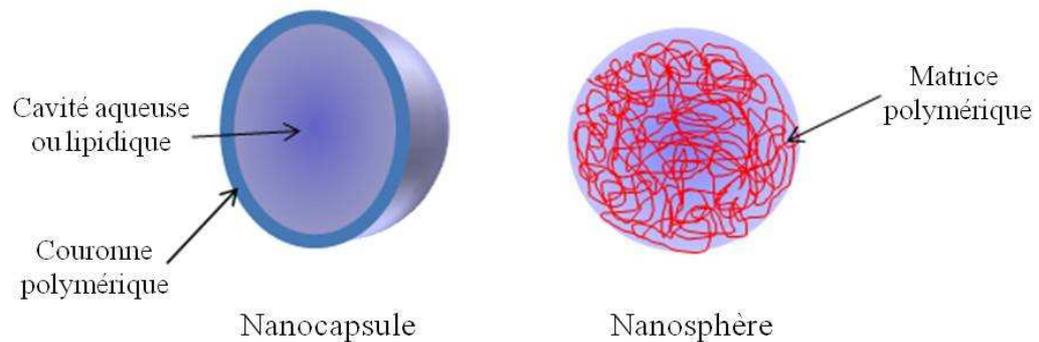


Figure 1.10. Représentation schématique de deux types de NPs, soit des nanocapsules et des nanosphères. Schéma adapté de Brigger *et al.* (2002).

Les NPs peuvent être préparées à partir de polymères naturels (*e.g.* dextran, chitosan, alginate) ou synthétiques (*e.g.* poly(acide lactique), poly(caprolactone), poly(cyano)acrylate)) (De Jong et Borm 2008). Cependant, dans le cas de la thérapie génique, la présence d'interactions électrostatiques est nécessaire afin d'assurer une incorporation efficace des ONs au sein du vecteur. Ainsi, Patil *et al.* (2009) ont démontré que l'incorporation de pARNis ciblés contre le gène de la luciférase dans une NP de poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) était doublée grâce à l'addition de poly(éthylèneimine) (PEI) dans la matrice polymère. Malgré ces résultats prometteurs, l'habileté du système à protéger le matériel génétique contre la dégradation enzymatique n'a pas été démontrée.

L'internalisation cellulaire des NPs dépend généralement d'un mécanisme d'endocytose, ce qui résulte en un confinement des NPs dans le compartiment endosomal/lysosomal où elles seront dégradées, puis éliminées. De plus, la nature hydrophile

et anionique des ONs rendent difficile leur incorporation dans les nanosphères, surtout dans le cas de systèmes à base de polymères hydrophobes neutres, alors que leur absorption à la surface de la particule les rend davantage susceptibles à une dégradation chimique/enzymatique. Conséquemment, les NPs demeurent des candidats peu adaptés pour le transport des ONs en thérapie génique (Lambert *et al.* 2001).

3.4.1.2.2. Les polyplexes

Les polyplexes sont des complexes polymères qui résultent de l'association spontanée de polymères cationiques avec des acides nucléiques (figure 1.11 a). Les polyplexes permettent d'incorporer le matériel génétique au cœur du vecteur et ainsi de le protéger contre une dégradation enzymatique. Les polymères cationiques les plus couramment employés dans la préparation des polyplexes sont les poly(lysine)s (PLys), les dérivés de poly(méthacrylate d'aminoalkyle), tels que le poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle (PDMAEMA), et le PEI (linéaire et branché) (figure 1.11 b). Les dendrimères cationiques, tels que les dérivés de poly(amidoamine) (PAMAM), sont également couramment utilisés en thérapie génique afin de complexer le matériel génétique. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de transfection d'ON par les polyplexes (Merkel *et al.* 2009). Plus particulièrement, le PEI est reconnu pour sa grande efficacité de transfection *in vitro*. En effet, en plus de protéger efficacement les acides nucléiques contre la dégradation et de permettre un haut taux d'internalisation, le PEI assure un mécanisme de déstabilisation de la membrane endosomale grâce à un effet tampon découlant de la présence de plusieurs fonctions amines.

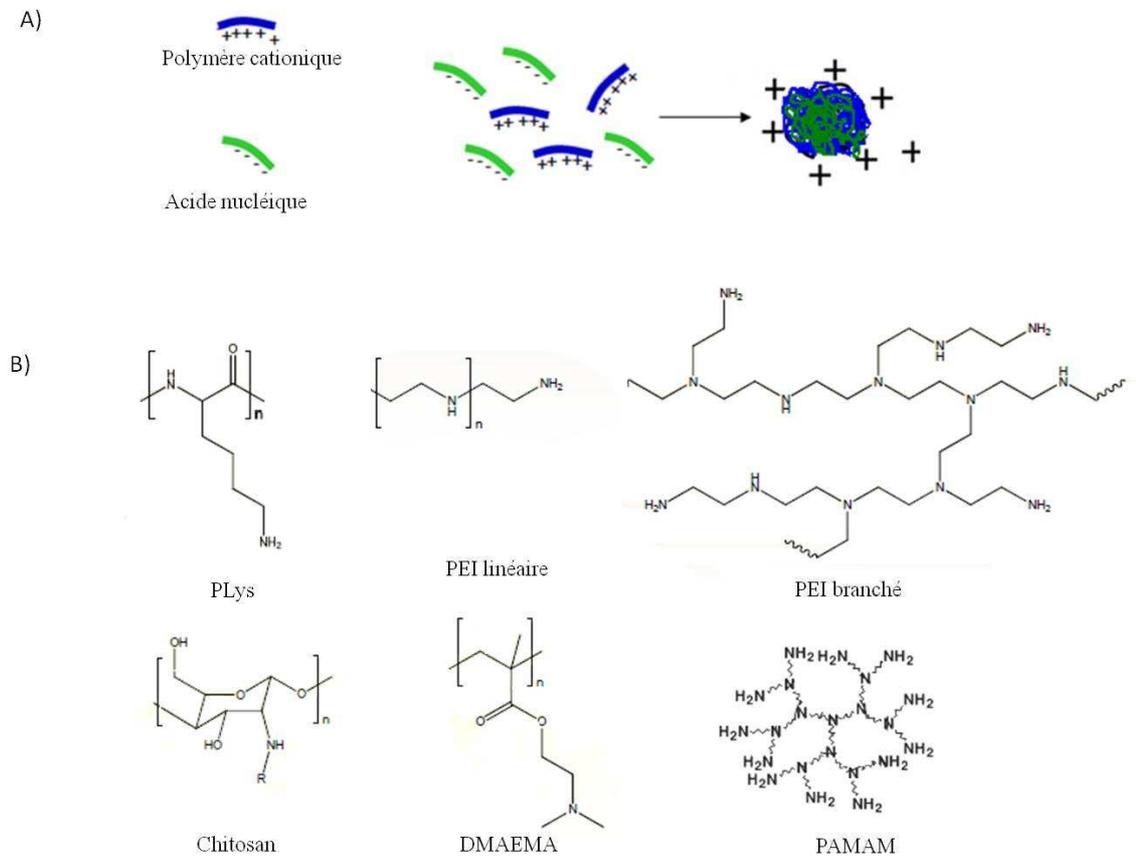


Figure 1.11. Représentation schématique de polyplexes (A) et de la structure des principaux polymères cationiques utilisés dans la préparation des polyplexes (B).

À l'instar des lipoplexes, l'excès de charge positive des polyplexes favorise le rapprochement et l'interaction avec la membrane plasmique, ce qui permet leur endocytose. Les groupements amine des copolymères cationiques leur confèrent une activité endosomolytique qui favorise le passage transmembranaire du matériel génétique vers le cytosol (Boussif *et al.* 1999). En effet, ces groupements permettent de ralentir l'acidification du compartiment endosomolytique *via* un effet tampon. Les ATPases, des enzymes responsables de l'acidification de l'endosome, doivent alors importer davantage de protons vers l'endosome pour maintenir l'acidité du milieu (figure 1.12). Cet influx

s'accompagne de l'entrée stoechiométrique d'ions chlorure et conduit à un déséquilibre osmolytique qui entraîne la rupture de l'endosome et la libération des complexes dans le cytosol. Un tel mécanisme est décrit sous le terme « éponge à protons » (Behr 1997). Bien qu'à maintes reprises remis en question, ce mécanisme demeure l'argument principal employé pour expliquer la forte efficacité *in vitro* du PEI. En effet, sa composition en amines primaire (25%), secondaire (50%) et tertiaire (25%) lui procure une importante capacité tampon en milieu acide ($pK_a \sim 5,5$). Toutefois, sa toxicité importante limite son utilisation *in vivo* (Liua *et al.* 2010).

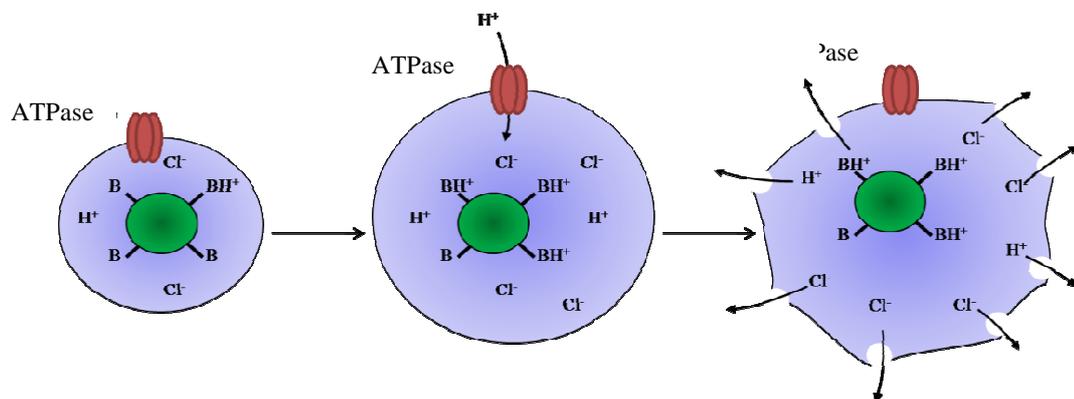


Figure 1.12. Mécanisme « d'éponge à protons ». La protonation du polymère sensible au pH (vert) entraîne un accroissement d'influx de proton (et de contre-ions). L'augmentation de la pression osmotique induit la rupture de l'endosome et la libération de son contenu dans le cytosol. Schéma adapté de Pack *et al.* (2005).

Tout comme pour les lipoplexes, un excès de charges positives est généralement requis lors de la formation des polyplexes afin d'éviter l'agrégation des complexes en solution aqueuse. Cependant, une fois dans la circulation systémique, cette charge positive apparente favorise l'opsonisation du vecteur et conduit son élimination rapide (Kabanov et Kabanov 1995). Les polyplexes sont également considérés toxiques à cause de leurs interactions et accumulation non spécifiques. Certains de ces inconvénients peuvent être surmontés en modifiant la surface des polyplexes avec des chaînes de polymère hydrophiles

neutres, telles que des chaînes de PEG. Ce dernier forme une couronne hydrophile neutre autour du complexe qui stabilise, minimise les interactions non-spécifiques, et accroît le temps de circulation sanguine du vecteur. La structure des polyplexes PEGylés s'apparente à la structure cœur/couronne des micelles polyioniques décrites dans la section suivante.

3.4.1.2.3. Les micelles polyioniques

3.4.1.2.3.1. Définition

Les micelles polymères sont des particules colloïdales formées à la suite de l'association spontanée de polymères amphiphiles lorsque la concentration atteint la concentration micellaire critique (CMC) (figure 1.13 a). Les polymères s'organisent de manière à diminuer leurs interactions avec l'eau, ce qui conduit à une ségrégation de phase et donne lieu à la formation d'un cœur hydrophobe stabilisé par une couronne hydrophile (structure dite cœur/couronne) (Francis *et al.* 2004, Lukyanov et Torchilin 2004). La ségrégation de ces domaines contribue à la diminution de l'énergie d'interface entre les deux environnements et à l'augmentation de l'entropie du solvant (*i.e.* l'eau), ce qui rend le processus de complexation énergétiquement favorable (Atkins 1997, Lukyanov et Torchilin 2004). Les micelles sont maintenues dans un équilibre dynamique en solution dans lequel un échange continu se produit entre les chaînes de polymère présentes sous forme d'unimères et celles formant la micelle (Hurtrez *et al.* 1998). Pour ce qui est de la thérapie génique, la nature anionique du matériel génétique rend difficile son incorporation dans le cœur hydrophobe des micelles polymères traditionnelles. Toutefois, l'utilisation de copolymères blocs polycationiques permet de remédier à ce problème. La complexation d'acides nucléiques par les polymères diblocs cationiques donne lieu à des complexes appelés micelles polyioniques (PICMs ; *polyion complex micelles*) (figure 1.13 b).

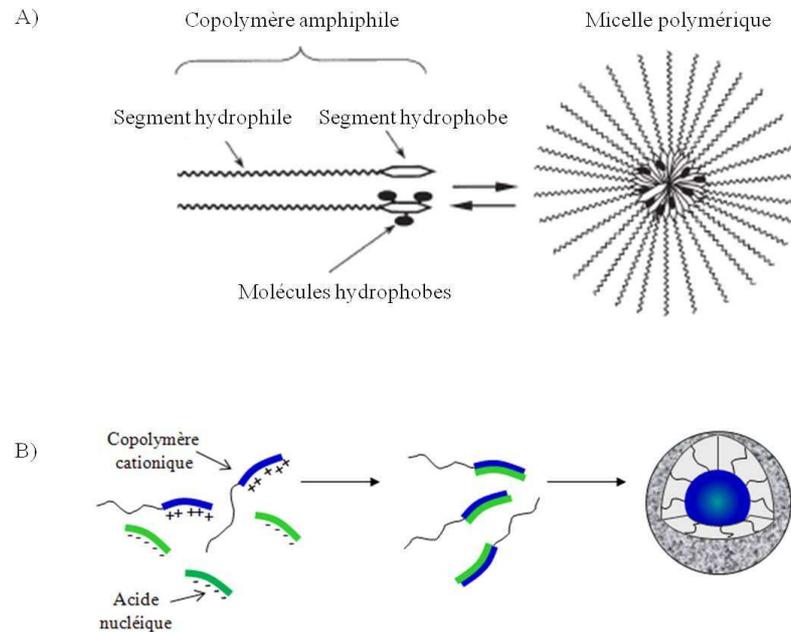


Figure 1.13. Représentation schématique du mécanisme de formation de micelles polymères (A) et de PICMs (B). Schémas adapté de Torchilin (2004) et Dufresne *et al.* (2003), respectivement.

L'assemblage spontané des PICMs est induit par la neutralisation des charges portées par un copolymère ionique par un contre-polyion, suivi de la ségrégation des domaines neutres/hydrophobes ainsi formés (figure 1.13 b). Ainsi, les polymères cationiques neutralisent les acides nucléiques ce qui donne lieu à la formation de domaines hydrophobes et, ultimement, à la formation d'un cœur hydrophobe stabilisé par une couronne hydrophile. La couronne hydrophile permet non seulement de stabiliser l'interface cœur/couronne des micelles mais masque aussi toute charge résiduelle, diminuant ainsi les interactions non spécifiques avec les diverses composantes de la circulation sanguine. La couronne hydrophile contribue ainsi à diminuer l'opsonisation et la reconnaissance du vecteur par le SPM et, ultimement, à augmenter la demi-vie du vecteur (Harada-Shiba *et al.* 2002, Dufresne *et al.* 2008, Kim *et al.* 2008). La structure de type

cœur/couronne des PICMs permet de concentrer et protéger le matériel génétique contre une dégradation enzymatique/chimique prématurée (Dufresne *et al.* 2008).

La couronne hydrophile est généralement formée de chaînes de PEG de poids moléculaire compris entre 2 et 15 kDa. Le PEG est une molécule biocompatible, non-immunogène et non-toxique. De plus, les chaînes de PEG en milieu aqueux ont une grande mobilité et un grand pouvoir d'hydratation (Torchilin 2007). Toutefois, le camouflage de la charge nette du vecteur par la couronne hydrophile réduit ses interactions avec la membrane cellulaire et diminue son efficacité de transfection (Wheeler *et al.* 1999). Afin de pallier à cet obstacle, le vecteur peut être décoré à sa surface avec une molécule de reconnaissance, telle qu'une protéine, une vitamine, un peptide ou un sucre. De tels ligands permettent d'augmenter la spécificité du vecteur et favoriser son internalisation cellulaire par endocytose.

3.4.1.2.3.2. La formation des PICMs

Les PICMs se forment spontanément grâce à la formation coopérative de liens électrostatiques intermoléculaires entre un copolymère cationique et un acide nucléique (Kabanov et Kabanov 1995). Ces interactions électrostatiques coopératives sont la force motrice qui guide le rapprochement et l'association des chaînes de charge opposée. Cet effet de coopérativité provient du fait que la probabilité de formation de liens électrostatiques entre le copolymère cationique et l'acide nucléique est favorisée une fois que la première liaison est établie et permet de renforcer ces liaisons électrostatiques. Ainsi, la constante d'équilibre de la formation de complexes polyioniques augmente de façon exponentielle en fonction de l'allongement de la longueur de la chaîne des polyions (Kakizawa et Kataoka 2002). De plus, la formation de complexes électrostatiques entraîne la libération en solution des contre-ions associés aux polymères cationiques et aux acides nucléiques. La libération de ces contre-ions s'accompagne d'un gain d'entropie qui rend le

processus de complexation énergétiquement favorable (Lukyanov et Torchilin 2004, Torchilin 2004). Dans un deuxième temps, la neutralisation des charges donne naissance à des domaines hydrophobes qui s'associent entre eux, entre autres, par des interactions de types hydrophobes. Ainsi, en plus des interactions électrostatiques, des interactions de type van der Waals contribuent à former et à stabiliser davantage le cœur micellaire ainsi que la structure cœur/couronne qui en résulte (Lukyanov et Torchilin 2004).

Pour être efficaces, les micelles doivent maintenir leur intégrité jusqu'au site d'action afin de protéger leur contenu et assurer une accumulation du produit actif au niveau du tissu cible. Par conséquent, les micelles doivent présenter une grande stabilité cinétique et donc un faible taux de dissociation lorsque la concentration micellaire est en deçà de la CMC. Il est possible de moduler la stabilité des micelles en modifiant les propriétés des copolymères cationiques et/ou du matériel génétique, tels que la densité de charge, l'hydrophobicité et la masse molaire (Kakizawa et Kataoka 2002, Fischer *et al.* 2004). La réticulation de la couronne ou du cœur de la micelle sont également des approches permettant d'augmenter la stabilité des micelles (Gaucher *et al.* 2005). Par exemple, Kataoka *et al.* (2001) ont conjugué un ON dans le cœur des micelles de PEG-*b*-PLys par des liaisons disulfures afin d'assurer sa dissociation sélective dans le milieu intracellulaire. En effet, la concentration élevée de la glutathione, un puissant agent réducteur, dans le milieu intracellulaire rend cet environnement beaucoup plus réducteur que le milieu extracellulaire.

3.4.1.2.3.3. Préparation des PICMs

Tel que mentionné à la section précédente, les PICMs sont obtenues de façon spontanée lors du mélange des composantes à une concentration supérieure à la CMC. Leur formation et leurs propriétés physicochimiques sont fortement influencées par l'ordre d'addition des composés (plus particulièrement si la micelle est formée de plus de deux

constituants), la concentration en matériel génétique, la force ionique du milieu, la structure chimique des copolymères ainsi que le ratio de charges (Kakizawa et Kataoka 2002). Ce ratio, défini comme ratio +/-, représente le nombre de charges positives (portées par le copolymère cationique) sur le nombre de charges négatives (portées par le polyanion). En plus d'affecter l'efficacité d'incorporation du matériel génétique, le ratio de charges est un paramètre particulièrement critique affectant également les propriétés colloïdales des micelles. Par exemple, Dufresne *et al.* (2008) ont montré que le ratio de charge était inversement proportionnel à l'indice de polydispersité (IP) des complexes formés. En effet, les PICMs préparées à un ratio de charges (+/-) inférieur à 0,56/1 (ou un ratio N/P de 1,5) étaient caractérisées par une distribution multimodale de la population alors que les PICMs préparées avec plus de charges positives présentaient une diminution de l'IP. Les ratios de charges (+/-) peuvent également être exprimés en terme de ratio molaire N/P, soit la densité d'amine constituant le copolymère cationique sur la densité molaire de phosphates constituants l'ON. Dans le cadre de ce mémoire, les ratios seront exprimés en terme de ratio molaire.

3.4.1.2.3.4. Structure des copolymères cationiques

Outre le ratio de charges, la structure chimique des copolymères affecte grandement les propriétés des micelles. Si la couronne des PICMs est généralement constituée de PEG, la composition du segment cationique formant le cœur de la micelle est plus variable. Les principaux polymères cationiques utilisés dans la composition des PICMs sont les dérivés de méthacrylate d'aminoalkyle, le PEI, les PLys et les spermines (Torchilin 2007) (figure 1.11). Plus particulièrement, le DMAEMA est intéressant puisqu'il est possible de moduler l'hydrophilie du polymère, et donc du cœur de la micelle, en quaternisant l'amine tertiaire du polymère. De nombreuses études rapportent l'utilisation du DMAEMA dans la formulation de complexes polyioniques avec l'ON et leur potentiel à condenser efficacement le matériel génétique et augmenter le taux de transfection (Rungsardthong *et*

al. 2001, Deshpande *et al.* 2002, Tan *et al.* 2006, He *et al.* 2008, Convertine *et al.* 2009, Benoit *et al.* 2010). Le tableau 1.3 présente quelques exemples de copolymères bloc cationiques utilisés dans le cadre de la vectorisation d'acides nucléiques pour des applications en thérapie génique.

Tableau 1.3. Propriétés de quelques formulations de PICMs utilisées en thérapie génique pour le transport de matériel génétique.

Composition du vecteur	Nature de l'acide nucléique incorporé	Tailles (nm) (IP [§])	Références
PEG- <i>b</i> -P(DMAEMA) PEG- <i>b</i> -P(AEMA)	ON	30 (IP~ 0,1) 70 (IP~ 0,1)	(Dufresne <i>et al.</i> 2008)
PEG- <i>b</i> -P(AEMA) et P(MAA- <i>co</i> -EA- <i>co</i> -BMA)	ON	30 (IP~ 0,1)	(Yessine <i>et al.</i> 2007)
Fab'-PEG- <i>b</i> -P(PrMA- <i>co</i> -MAA) PAMAM	pARNi, ON	50-70 (IP< 0,2)	(Elsabahy <i>et al.</i> 2009)
Fab'-PEG- <i>b</i> -PEI	ADN plasmidique	200	(Merdan <i>et al.</i> 2003)
Transferrine-PEG- <i>b</i> -PEI	ON ADN plasmidique	75-103 > 200	(Vinogradov <i>et al.</i> 1999) (Kursa <i>et al.</i> 2003)
Folate-PEG- <i>b</i> -PEI	pARNi	232	(Kim <i>et al.</i> 2005)
PEG- <i>b</i> -PLys	ADN plasmidique ON	80 55	(Kataoka 2001) (Kakizawa et Kataoka 2002)
PEG-SS-P(Asp(DET))	ADN plasmidique	80	(Takae <i>et al.</i> 2008)
Lac-PEG-ON & PLys	ON	N/D	(Oishi <i>et al.</i> 2005)

PrMA : méthacrylate de propyle

Asp(DET) : poly(aspartamide) *N*-(2-aminoéthyle)-2-aminoéthyle

N/D : donnée non disponible.

La facilité de préparation des copolymères cationiques est un atout majeur à leur utilisation. Les copolymères cationiques sont généralement préparés à partir de méthodes de polymérisation dites « vivantes et contrôlées ». Ce contrôle repose sur des mécanismes de polymérisation qui procèdent en l'absence de réactions de transfert de chaîne et/ou de

réactions de terminaison. Ainsi, toutes les chaînes sont amorcées simultanément et croissent à la même vitesse, ce qui permet d'obtenir des polymères de taille et d'architecture bien définies ainsi que des distributions de masse molaire étroites (Matyjaszewski 1998, Xia 2001). Selon la nature des monomères utilisés, les polymères cationiques peuvent être préparés par ouverture de cycle (PLys), par polymérisation anionique ou cationique (PEI linéaire) et par polymérisation radicalaires contrôlées (DMAEMA, AEMA), telles la polymérisation par transfert de chaîne avec addition-fragmentation réversible (RAFT ; *reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*) et la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (PRTA). Cette dernière méthode a été développée sur la base de l'addition radicalaire par transfert d'atome (ARTA) par Matyjaszewski (1995). Lorsque le cycle activation/propagation/désactivation de la ARTA peut se répéter jusqu'à ce que tous les monomères soient « consommés », il en résulte un processus de polymérisation en chaîne appelé PRTA (figure 1.14) (Wang et Matyjaszewski 1995, Pintauer et Matyjaszewski 2008). Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons utilisé la PRTA pour préparer les copolymères cationiques entrant dans la composition des PICMs. La polymérisation anionique par ouverture de cycle (PAOC) a d'autre part été utilisée pour la synthèse de PEG hétérofonctionnalisé par des groupements thiol et hydroxyle (HS-PEG-OH).

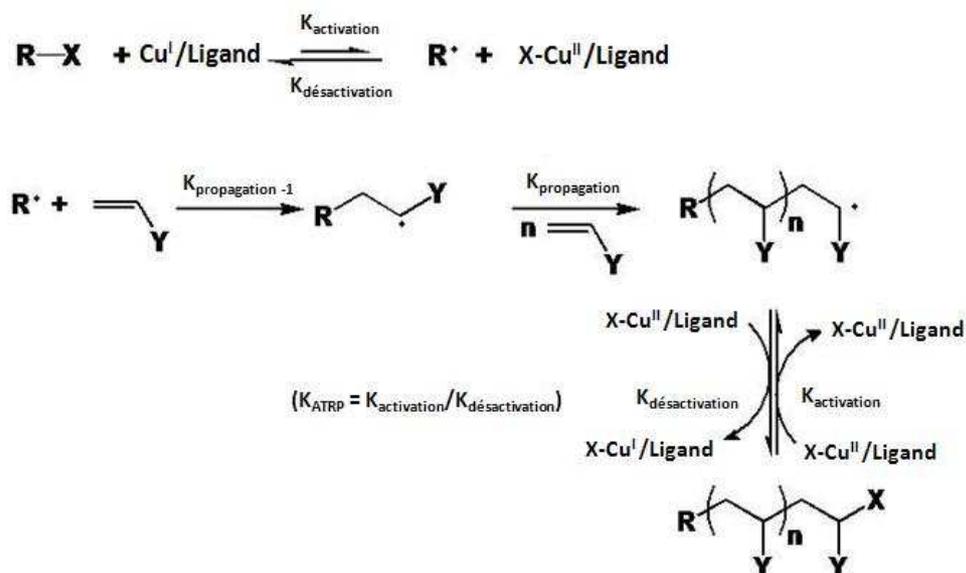


Figure 1.14. Mécanisme détaillé de la PRTA. Schéma adapté Matyjaszewski (<http://www.cmu.edu/maty/chem/fundamentals-atrp/atrp.html>, juillet 2010).

Les polymérisations radicalaires contrôlées, telles que la PRTA, reposent sur l'instauration d'un équilibre dynamique entre des espèces vivantes (espèces radicalaires croissantes) et dormantes (figure 1.15) (Xia 2001). La forme dormante étant l'espèce favorisée lors de cet équilibre, la concentration en espèces radicalaires demeure faible et les réactions de terminaison peu nombreuses, ce qui assure un contrôle sur les propriétés du produit final (Matyjaszewski 1998). La PRTA est basée sur la création d'une espèce radicalaire (R^{\bullet}) et l'oxydation du métal ($\text{M}_t^{\text{Z}+1}$) à partir de l'espèce dormante (R-X) et d'un complexe métal/ligand ($\text{M}_t^{\text{Z}}/\text{ligand}$). L'efficacité de la PRTA repose sur la capacité du métal de transition (M_t) d'étendre sa sphère de coordination et d'augmenter son degré d'oxydation pour pouvoir capter un atome d'halogène (Wang et Matyjaszewski 1995, Matyjaszewski et Timothy 1998). Le radical libre (ou la chaîne en croissance, selon l'étape de propagation) peut alors réagir sur les monomères (k_p), se terminer (k_t) ou être désactivé ($k_{\text{désact}}$) à la suite de la capture d'un atome d'halogène. La modulation des conditions

initiales de polymérisation, telles que la température, le temps de réaction, la nature du solvant, du métal et du ligand, permet d'assurer une croissance linéaire du poids moléculaire du polymère et un faible indice de polymolécularité ($IP < 1,1$) (Matyjaszewski 1998). La PTRA est utilisée pour polymériser des méthacrylates, méthacrylamides, acides méthacryliques, styrènes et l'acrylonitrile (Xia 2001).

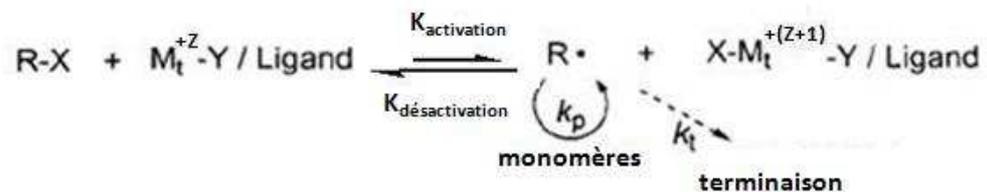


Figure 1.15. Mécanisme général de la PTRA où $R-X$ est le dérivé d'halogène (espèce dormante), M_t représente le métal de transition, Y le contre-ion (le plus souvent un halogène) et $R\bullet$ est la chaîne croissante radicalaire (espèce vivante). Figure adaptée de Matyjaszewski (2001).

La PAOC permet, entre autres, la synthèse de PEG fonctionnalisé en bout de chaîne par des groupements hydroxyle, amine ou thiol, selon les réactifs initiaux. Les polymérisations anioniques sont caractérisées par l'absence de réaction de terminaison (Young *et al.* 1984, Hadjichristidis *et al.* 2001). En effet, la nature anionique du centre actif induit une répulsion entre les anions et empêche ainsi les réactions de terminaison. Par ailleurs, la polymérisation doit être effectuée sous conditions anhydres puisque des traces d'eau et d'air peuvent interagir avec les anions de la chaîne croissante et mettre fin à la polymérisation. De plus, afin de maintenir un contrôle sur la distribution et la croissance des chaînes, la polymérisation anionique demande, d'une part, une réaction d'amorçage rapide et, d'autre part, une réaction de propagation relativement lente (Hsieh et Quirk 1996). Dans le cadre de la synthèse du PEG hétérofonctionnalisé par une fonction thiol et un groupement hydroxyle, la polymérisation est amorcée par l'attaque électrophile de

l'oxyde d'éthylène par le *tert*-butyle thiolate, suite à sa déprotonation par le potassium de naphthalène (figure 1.16) (Dufresne *et al.* 2005).

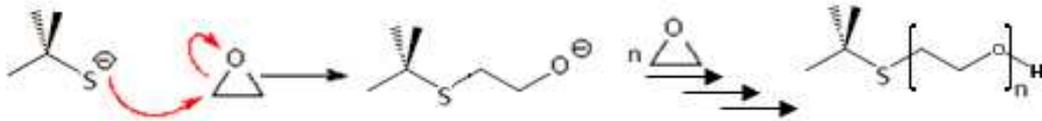


Figure 1.16. Mécanisme de la PAOC de l'oxyde d'éthylène par le *tert*-butyle mercaptan.

4. TRAFIC EXTRA ET INTRACELLULAIRE

L'utilisation des PICMs pour l'administration de matériel génétique permet d'obtenir des systèmes de taille nanométrique (10-100 nm) dans lesquels le matériel génétique est concentré et protégé. Leur taille ainsi que leur couronne hydrophile leur confèreraient un caractère furtif et un temps de circulation prolongé dans la circulation sanguine. Cependant, ces avantages sont contre-balançés par leurs interactions cellulaires limitées. Diverses stratégies peuvent donc être exploitées afin de permettre aux micelles d'atteindre leur cible intracellulaire, soit, par exemple, le cytoplasme des cellules tumorales.

4.1. Le ciblage passif

An niveau des tissus tumoraux, la prolifération cellulaire est forte et rapide. Au-delà d'une certaine taille, les tumeurs créent leur propre réseau vasculaire afin de soutenir leurs besoin nutritionnels et d'accélérer leur croissance. Ce phénomène est connu sous le nom d'angiogénèse. Contrairement aux vaisseaux sanguins normaux, les néo-vaisseaux tumoraux présentent une perméabilité accrue, ce qui facilite l'épanchement de l'oxygène et des nutriments à travers l'espace interstitiel (Mahmud *et al.* 2007). En effet, les cellules

tumorales sécrètent certains facteurs qui contribuent à augmenter la perméabilité locale des vaisseaux sanguins, tels que le facteur de croissance VEGF qui a été identifié comme un facteur clé dans la stimulation de l'angiogenèse et l'activation de la production de NO, lequel contribue à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Levy *et al.* 1996). Par ailleurs, les nouveaux vaisseaux sanguins des tumeurs sont caractérisés par une imperfection et une discontinuité au niveau des jonctions intercellulaires des cellules de l'endothélium vasculaire, ce qui contribue également à la perméabilité accrue des vaisseaux des tissus pathologiques (Mahmud *et al.* 2007). En effet, cette discontinuité est due, entre autres, à une usure et une perte d'intégrité des jonctions entre les cellules endothéliales ainsi qu'à une diminution des interactions cellules-cellules et cellules-matrice attribuées à une réduction de l'expression de certains facteurs, dont la cadhérine vasculaire endothéliale (Maeda *et al.* 2000). De plus, cette perméabilité vasculaire s'accompagne d'une diminution du drainage lymphatique au niveau des tumeurs, ce qui favorise la rétention des molécules dans l'environnement tumoral. Globalement, ce phénomène est appelé effet de perméabilité et rétention accrues (effet EPR ; *enhanced permeability and retention effect*) et fut proposé pour la première fois par Maeda et Matsumura (1986). Cette équipe a mis en évidence l'accumulation passive de macromolécules (< 200 nm) dans les tissus pathologiques (tumoraux ou inflammés) suggérant ainsi l'existence d'un mécanisme de rétention passive (figure 1.17) (Maeda et Matsumura 1986, Mahmud *et al.* 2007). Depuis, un grand nombre de systèmes exploitent ce phénomène pour favoriser leur accumulation au niveau des tissus pathologiques (Torchilin 2010). Par exemple, Jeong *et al.* (2005) ont montré une diminution significative de la croissance tumorale suite à l'accumulation passive de PICMs de PEI/PEG-ON/PEI au niveau des cellules tumorales. Plus récemment, Kano *et al.* (2009) ont démontré que le temps de circulation de PICMs de PEG-PLys/pARNi, et ultimement leur accumulation passive au niveau des tumeurs, pouvaient être modulé en variant la longueur de la chaîne de PEG constituant la couronne hydrophile ainsi que la proportion de PEG greffée au système.

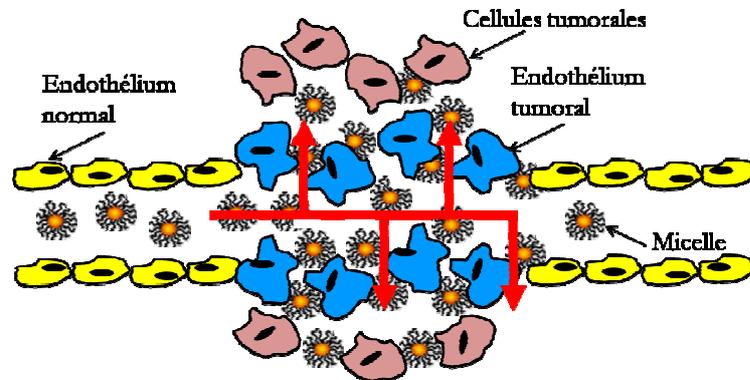


Figure 1.17. Représentation schématique de l'effet EPR. Schéma adapté de Brigger *et al.* (2002).

En thérapie génique, cette stratégie de ciblage est particulièrement intéressante puisqu'elle ne requiert pas de fonctionnalisation supplémentaire du système et ne se base que sur la taille (< 200 nm) des particules. En revanche, son efficacité est variable puisqu'elle dépend du type de tumeur. Le ciblage passif constitue une stratégie intéressante lorsque le vecteur est capable de maintenir son intégrité (résister à la dissociation) dans la circulation sanguine, est en mesure de retenir sa cargaison et la protéger contre une dégradation enzymatique/chimique jusqu'à son extravasation dans le tissu tumoral cible.

4.2. Le ciblage actif

Il a été rapporté que le ciblage actif n'affectait généralement pas la déposition du vecteur au niveau des cellules tumorales, mais permettrait plutôt d'améliorer l'internalisation de ce dernier *via* endocytose récepteur-dépendante (Kirpotin *et al.* 2006). Un tel ciblage peut être obtenu en associant au vecteur une molécule de reconnaissance spécifique à un récepteur surexprimé ou uniquement exprimé par la cellule cible. Le ciblage actif est donc une approche complémentaire au ciblage passif et permet d'accroître la spécificité du vecteur et l'efficacité de la thérapie en favorisant son internalisation cellulaire

(Torchilin 2010). De nombreux vecteurs synthétiques ont été conjugués à des ligands et testés *in vitro* et/ou *in vivo*. Le tableau 1.4 répertorie quelques exemples de ligands couramment utilisés en thérapie génique. Par exemple, Heidel *et al.* (2007) ont utilisé la transferrine en tant que molécule de reconnaissance afin de cibler spécifiquement les cellules tumorales du sarcome d'Ewing. À cette fin, un pARNi a été incorporé dans des polyplexes de cyclodextrine fonctionnalisés en surface par la transferrine. Ce vecteur a permis une internalisation spécifique au niveau de ces cellules ainsi qu'une diminution de l'expression du gène EWS-FL 11 et l'inhibition de la croissance de la tumeur. De plus, ce vecteur s'est avéré sécuritaire pour le transport de pARNi chez des primates (Heidel *et al.* 2007). Merdan *et al.* (2003) ont également rapporté un accroissement de l'internalisation cellulaire (de 6 fois supérieur) des complexes de PEG-PEI (25 kDa)/ADN plasmidique conjugués à un fragment d'anticorps dirigé contre des cellules du cancer des ovaires comparativement à ceux dépourvus d'une molécule de reconnaissance. Cette augmentation de la capture cellulaire s'est traduite par une augmentation de l'expression du gène de luciférase.

Tableau 1.4. Présentation de divers ligands, de leurs récepteurs et de leurs cibles utilisés en thérapie génique *in vitro*.

Ligands	Récepteurs	Cibles	Références
Anticorps anti-acide glyofibrillaire	N/D*	Cellule endothéliale de cerveau de rat	(Torchilin 2004)
Anticorps anti-CD3	CD3	Lymphocytes T	(Buschle <i>et al.</i> 1995)
Anticorps 2C5	N/D*	Cellule leucémique Cellule épithéliale (cancer du sein) Cellule de Lewis (Poumon)	(Torchilin <i>et al.</i> 2003) (Chekhonin <i>et al.</i> 1991)
Anticorps anti-CD71	Récepteur de la Transferrine (CD71)	Cellule du cancer de la prostate	(Elsabahy <i>et al.</i> 2009)
Asialoglycoprotéine	Asialoglycoprotéine	Hépatocyte	(Hara <i>et al.</i> 1995) (Wu et Wu 1988)
Biotine	Récepteur à la biotine	Cellule du cancer du sein Cellule de l'épithélium oral de type pavimenteux stratifié	(Vinogradov <i>et al.</i> 1999)
Galactose	Récepteur du galactose	Hépatocyte	(Kawakami <i>et al.</i> 2008)
Lactose/Galactose	Lectine	Hépatocyte Épithélium respiratoire	(Plank <i>et al.</i> 1992) (Fajac <i>et al.</i> 1999)
Mannose	Récepteur du Mannose	Cellule nonparenchymateuse	(Kawakami <i>et al.</i> 2008)
Peptide MPG	Récepteur au peptide MPG	Fibroblaste humain	(Mintzer et Simanek 2009)
Transferrine	Récepteur à la transferrine (CD71)	Cellule d'érythroblaste aviaire Hépatocyte	(Wagner <i>et al.</i> 1990) (Vinogradov <i>et al.</i> 1999)

N/D* : donnée non disponible

Parmi les ligands utilisés, les anticorps ont reçu une attention particulière de par leur très haute affinité et spécificité pour leurs récepteurs. De plus, la diversité des anticorps disponibles permet d'atteindre un très grand nombre de cibles. Les anticorps monoclonaux, ou immunoglobulines (Ig), peuvent être classés en 5 grandes familles, soit les IgM, IgA, IgE, IgD et les IgG. Plus particulièrement, les IgG sont les immunoglobulines les plus présentes dans le sérum humain (80% des Ig sériques) et sont associées à l'opsonisation des

corps étrangers. Les IgG1, une sous-classe des IgG, représentent près de 66% des IgG présents dans la circulation sanguine. Les anticorps anti-CD71 utilisées dans le cadre de ce projet de maîtrise font partis de la famille des IgG1. Les Ig sont des glycoprotéines formées de quatre chaînes polypeptidiques (2 chaînes lourdes et de chaînes légères) reliées entre elles par des ponts disulfures, assurant une flexibilité de la macromolécule (figure 1.18). La structure d'une immunoglobuline peut être représentée en trois régions, soit deux fragments identiques appelés fragments Fab' et un fragment Fc. Ce dernier est responsable du caractère immunogène de l'anticorps, de l'activation du système du complément et des interactions avec les cellules de types macrophages, monocytes et neutrophiles par l'intermédiaire de leurs récepteurs FcR. Le fragment Fab', constitué d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, confère à l'anticorps sa spécificité et lui permet de se lier à l'antigène (figure 1.18) (Garnett 2001, Chapman 2002). Ainsi, les fragments, $F(ab)_2$ ou Fab', dépourvus de pouvoir immunogène, sont généralement employés et conjugués au vecteur afin de limiter les interactions et l'activation du système SPM, prolongeant ainsi le temps de demi-vie du vecteur (Chapman 2002). De plus, dans le cadre de la préparation d'immunomicelles (soit des micelles ciblées par un anticorps), la conjugaison d'un fragment d'anticorps, au lieu d'un anticorps complet, est préconisée puisque ceci diminue également l'encombrement stérique imposé lors de la formation des micelles.

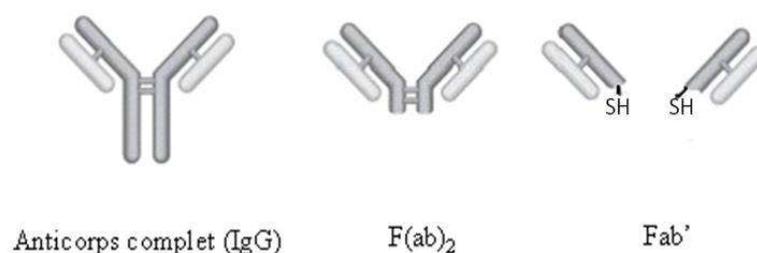


Figure 1.18. Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline de type IgG.

4.2.1. Les récepteurs à la transferrine et l'antigène de surface CD71

Le ciblage des récepteurs à la transferrine *via* une molécule de transferrine ou un anticorps constitue un modèle de ciblage largement répandu en thérapie génique (Shi et Pardridge 2000, Kircheis *et al.* 2001, Ogris et Wagner 2002, Qian *et al.* 2002, Yu *et al.* 2009). Par exemple, Tietze *et al.* (2008) ont observé une diminution significative de l'expression de l'ARNm *in vitro* et *in vivo* dans des cellules tumorales, après avoir incorporé une molécule de transferrine ciblée vers le récepteur à la transferrine à la surface d'un vecteur de β -propionamide conjugué à un oligoéthylènimine (OEI-HD)/pARNi. La réduction de l'expression de l'ARNm s'est traduite par une diminution de la croissance de la tumeur et ultimement par l'apoptose des cellules tumorales.

Les récepteurs à la transferrine (CD71) sont responsables de l'approvisionnement en fer, indispensable au métabolisme cellulaire et sont exprimés par de nombreuses cellules, particulièrement celles en prolifération, telles que les cellules tumorales. L'apotransferrine est une glycoprotéine qui a pour rôle principal de lier et de transporter les ions ferriques dans la circulation sanguine, puis vers les cellules (Qian *et al.* 2002). Une fois liée aux molécules de fer, l'apotransferrine est alors appelée holotransferrine, ou transferrine. Le récepteur CD71 est une protéine ubiquitaire dont le niveau d'expression diffère selon la lignée cellulaire. Toutefois, sa densité d'expression est plus élevée dans les cellules synthétisant l'hémoglobine, les cellules en division, ainsi que dans les cellules tumorales (environ 10 000 à 100 000 sites de liaison pour chaque cellule) (Qian *et al.* 2002). Le récepteur CD71 est un homodimère constitué de deux unités transmembranaires de 85 kDa chacune reliée par deux ponts disulfures. Il contient trois domaines: cytoplasmique, transmembranaire et carboxyle-terminal extracellulaire. Ce dernier est considéré comme le domaine majeur du récepteur et permet la liaison avec les molécules de transferrine et/ou l'anticorps contre le récepteur à la transferrine (Ponka et Lok 1999). Compte tenu du fait que le ciblage actif de tissus pathologiques *via* la transferrine peut être inhibé par la présence d'une forte concentration systémique de transferrine endogène saturant les

récepteurs (et entrant en compétition avec la molécule de reconnaissance du vecteur), des anticorps monoclonaux se liant à l'épitope externe des récepteurs CD71 ont alternativement été développés. Les anticorps anti-CD71 peuvent ainsi inhiber la liaison de la molécule de transferrine à son récepteur et exercer un effet cytostatique. Cet effet permet de bloquer le fonctionnement et la multiplication cellulaire des cellules tumorales. Les complexes anticorps anti-CD71/récepteur CD71 sont internalisés par endocytose à la suite de l'activation du récepteur par le ligand (Ponka et Lok 1999).

4.3. Mécanisme d'internalisation cellulaire actif : l'endocytose

Comme il a été évoqué précédemment, l'internalisation des vecteurs synthétiques, en particulier les PICMs, procède par endocytose (Mukherjee *et al.* 1997). En absence de ciblage actif, l'internalisation est non spécifique et peut être faite par deux grandes voies: l'internalisation indépendante ou dépendante de la clathrine. L'endocytose indépendant de la clathrine comprends les voies d'endocytose dépendantes ou non à la cavéoline, la macropinocytose et la phagocytose (cellules phagocytaires) (figure 1.19 a) (Swanson et Watts 1995, Mukherjee *et al.* 1997, Garnett 2001). L'endocytose dépendante de la clathrine est initiée suite à la formation de puits recouverts de clathrine à la surface de la cellule qui s'invaginent pour former une vésicule intracellulaire. L'endocytose dépendante de la clathrine est préconisée lors du transport intracellulaire de macromolécules biologiques nécessaires au fonctionnement normal de la cellule (*e.g.* hormones, facteurs de croissance et protéines de transport d'ions métalliques (tel que l'apotransferrine)) (Garnett 2001). Cette voie est particulièrement favorisé par les cellules des tissus tumoraux puisqu'elles ont un important besoin d'approvisionnement en nutriments essentiels (Akhtar *et al.* 2000). Dans le cas d'un ciblage actif, telle que la reconnaissance d'un antigène par un anticorps, l'endocytose récepteur-dépendante est induite à la suite de l'activation du récepteur cellulaire par son ligand. Cette liaison active une cascade de signaux cellulaires qui conduit ultimement à l'internalisation du récepteur et de son ligand. Finalement, le vecteur se

retrouve internalisé dans des vésicules appelées endosomes. Une partie de ces endosomes est redirigée vers la membrane extracellulaire afin de permettre le recyclage des récepteurs impliqués dans l'activation de l'endocytose (figure 1.19 b). La majeure partie des endosomes évolue ensuite vers un compartiment tardif de l'endosome suite à une acidification progressive du milieu (pH ~ 5,5-6) par l'action des pompes à protons (Mukherjee *et al.* 1997). Ultimement, les endosomes tardifs fusionnent avec les lysosomes (pH ~ 4,5-5,5) qui renferment des hydrolases provoquant la dégradation enzymatique de leur contenu (Wattiaux *et al.* 2000). Pour exercer son action thérapeutique dans le cytosol ou le noyau, le matériel génétique doit donc échapper à l'endosome avant la fusion avec les lysosomes, à défaut de quoi il sera dégradé.

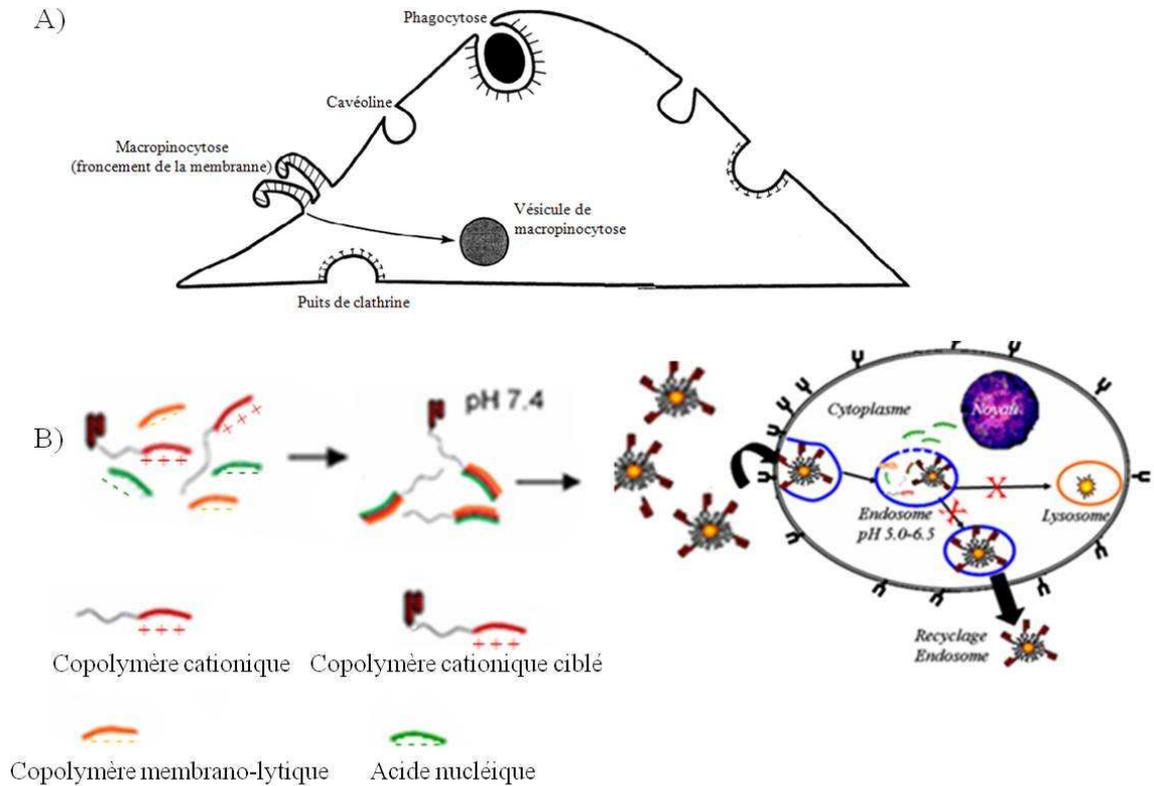


Figure 1.19. Représentation schématique des diverses voies d'endocytoses (A) (Schéma adapté de Mukherjee *et al.* 1997) et représentation schématique de l'internalisation cellulaire par endocytose récepteur-dépendante de PICMs (B).

4.4. Sortie des endosomes

La sortie de l'endosome est donc un défi inhérent à tous les vecteurs synthétiques internalisés par voie d'endocytose au niveau des cellules cibles. Tel que mentionné précédemment, de nombreuses stratégies ont été exploitées afin de promouvoir la libération du matériel génétique. Si les lipoplexes peuvent bénéficier du mécanisme de « flip-flop » (décrit à la section 3.4.1.1), les polyplexes et les PICMs, quant à eux, peuvent utiliser les propriétés d'« éponge à protons » de certains polymères aminés, tels que les PEI et les

dendrimères PAMAM (section 3.4.1.2.2) (Roth et Sundaram 2004). Cependant, la validité et l'efficacité du mécanisme d'« éponge à protons » sont encore controversées et il est donc essentiel d'identifier un mécanisme alternatif assurant la déstabilisation de la membrane endosomale. Ainsi, l'introduction d'un adjuvant aux propriétés pH-sensibles à la formulation du vecteur permettrait de favoriser le passage de l'endosome au cytoplasme (De Smedt *et al.* 2000, Pack *et al.* 2005). Par exemple, certains peptides présentent des propriétés membrano-lytique qui résultent d'un changement dans leur conformation (*i.e.* de pelote statistique à hélice α) suivant l'acidification du milieu (De Smedt *et al.* 2000, Wong *et al.* 2007). L'interaction de ces peptides avec la membrane endosomale/lysosomale est favorisée par cette conformation en hélice α et ainsi provoque une déstabilisation de l'organelle cellulaire et la libération de son contenu. Par ailleurs, certains copolymères d'acide méthacrylique présentent des propriétés membrano-lytiques. Ces polymères, chargés négativement à pH physiologique, se protonent suivant l'acidification rencontrée lors du transit des endosomes précoces aux lysosomes. Cette protonation résulte en une neutralisation des charges et une augmentation de leur hydrophobie. Il s'en suit un changement de conformation et un repliement de la chaîne polymère (figure 1.20). Dans le milieu endosomal, il a été démontré que ce changement de conformation pouvait induire une déstabilisation de la bicouche phospholipidique de la membrane endosomale et permettre la diffusion du matériel génétique vers le cytoplasme cellulaire (Yessine *et al.* 2006). Plus particulièrement, Yessine *et al.* (2007) ont démontré *in vitro* qu'à un pH de 5,5, des PICMs incorporant un copolymère de type poly(méthacrylique acide₅₀-co-éthyl acrylate₄₀-co-butyle méthacrylate₁₀) (P(MAA₅₀-co-EA₄₀-co-BMA₁₀) (pKa ~ 7,3) pouvaient induire la déstabilisation de la membrane endosomale.

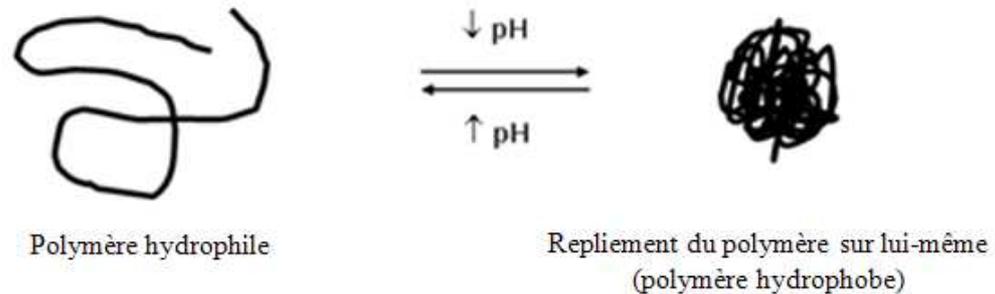


Figure 1.20. Représentation schématique du changement de conformation d'un copolymère d'acide méthacrylique en fonction du pH. Schéma adapté de Yessine *et al.* (2004).

5. CONCLUSION

En résumé, le matériel génétique et son vecteur sont confrontés à de nombreux obstacles *in vivo* afin d'atteindre leur site d'action. En effet, les vecteurs sont sujets à une rapide élimination de la circulation de par des interactions non-spécifiques avec les différentes composantes de la circulation sanguine. De plus, une accumulation non-spécifique au niveau de tissus sains peut induire une toxicité non désirée. Par ailleurs, l'internalisation des vecteurs par endocytose les séquestre dans le compartiment endosomal où leur contenu peut éventuellement être dégradé. La mise au point d'un vecteur « idéal » dont les propriétés permettraient à la fois une accumulation spécifique, une internalisation cellulaire médiée par des récepteurs, ainsi que la fuite de l'endosome vers le cytoplasme, permettrait d'augmenter son efficacité et son potentiel thérapeutique *in vivo*. Dans ce mémoire, nous nous proposons de mettre au point un vecteur répondant à ces critères, soit des PICMs ciblées incorporant un polymère endosomolytique.

BIBLIOGRAPHIE

Aboul-Fadl, T. (2005) Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem*; 12: 2193-214.

Akhtar, S., Hughes, M.D., *et al.* (2000) The delivery of antisense therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*; 44: 3-21.

Atkins, P.W. (1997) Macromolecules and colloids. *Physical Chemistry*; P.W. Atkins. New York Oxford University Press: 679-714.

Bangham, A.D., Standish, M.M., *et al.* (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*; 13: 238-52.

Barron, L.G., Gagne, L., *et al.* (1999) Lipoplex-mediated gene delivery to the lung occurs within 60 minutes of intravenous administration. *Hum Gene Ther*; 10: 1683-94.

Behr, J.-P. (1997) The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia*; 51: 34-6.

Benoit, D.S., Henry, S.M., *et al.* (2010) pH-Responsive polymeric siRNA carriers sensitize multidrug resistant ovarian cancer cells to doxorubicin via knockdown of polo-like kinase 1. *Mol Pharm.*

Bertin, S., Neves, S., *et al.* (2007) [Naked DNA and lipoplexes applications in cancer gene therapy]. *Bull Cancer*; 94: 243-52.

Biet, E., Larue, L., *et al.* (2003) [Homologous recombination and gene targeting]. *C R Biol*; 326: 51-64.

Boussif, O., Delair, T., *et al.* (1999) Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro. *Bioconjug Chem*; 10: 877-83.

Brigger, I., Dubernet, C., *et al.* (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*; 54: 631-51.

Buschle, M., Cotten, M., *et al.* (1995) Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum Gene Ther*; 6: 753-61.

- Cech, T.R., Zaugg, A.J., *et al.* (1981) In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*; 27: 487-96.
- Chapman, A.P. (2002) PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev*; 54: 531-45.
- Chekhonin, V.P., Kabanov, A.V., *et al.* (1991) Fatty acid acylated Fab-fragments of antibodies to neurospecific proteins as carriers for neuroleptic targeted delivery in brain. *FEBS Lett*; 287: 149-52.
- Convertine, A.J., Benoit, D.S., *et al.* (2009) Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery. *J Control Release*; 133: 221-9.
- Crooke, S.T. (1999) Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*; 1489: 31-44.
- Damha, M.J., Wilds, C.J., *et al.* (1998) Hybrids of RNA and arabinonucleic acids (ANA and 2'F-ANA) are substrate of ribonuclease H. *J Am Chem Soc*; 120: 12976-7.
- De Jong, W.H., Borm, P.J. (2008) Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*; 3: 133-49.
- De Smedt, S.C., Demeester, J., *et al.* (2000) Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res*; 17: 113-26.
- Deshpande, M.C., Garnett, M.C., *et al.* (2002) Influence of polymer architecture on the structure of complexes formed by PEG-tertiary amine methacrylate copolymers and phosphorothioate oligonucleotide. *J Control Release*; 81: 185-99.
- Dias, N., Stein, C.A. (2002) Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*; 1: 347-55.
- Doherty, E.A., Doudna, J.A. (2001) Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*; 30: 457-75.
- Dufresne, M.H., Elsbahy, M., *et al.* (2008) Characterization of polyion complex micelles designed to address the challenges of oligonucleotide delivery. *Pharm Res*; 25: 2083-93.

- Dufresne, M.H., Fournier, E., *et al.* (2003) Block copolymer micelles-engineering versatile carriers for drugs and biomacromolecules. *Challenge in drug delivery for the new millennium*; R Gurny, Editor, 96, Bulletin technique Gattefossé, Saint-Priest 87–102.
- Dufresne, M.H., Gauthier, M.A., *et al.* (2005) Thiol-functionalized polymeric micelles: from molecular recognition to improved mucoadhesion. *Bioconjug Chem*; 16: 1027-33.
- Eckstein, F. (2000) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*; 10: 117-21.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., *et al.* (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*; 411: 494-8.
- Elsabahy, M., Wazen, N., *et al.* (2009) Delivery of nucleic acids through the controlled disassembly of multifunctional nanocomplexes. *Adv Funct Mater*; 19: 1-6.
- Fajac, I., Briand, P., *et al.* (1999) Sugar-mediated uptake of glycosylated polylysines and gene transfer into normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther*; 10: 395-406.
- Felgner, P.L., Barenholz, Y., *et al.* (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther*; 8: 511-2.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., *et al.* (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84: 7413-7.
- Fischer, D., Dautzenberg, H., *et al.* (2004) Poly(diallyldimethylammonium chlorides) and their N-methyl-N-vinylacetamide copolymer-based DNA-polyplexes: role of molecular weight and charge density in complex formation, stability, and in vitro activity. *Int J Pharm*; 280: 253-69.
- Francis, M.F., Cristea, M., *et al.* (2004) Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. *Pure Appl Chem*; 76: 1321-35.
- Gao, X., Kim, K.S., *et al.* (2007) Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J*; 9: E92-104.
- Garnett, M.C. (2001) Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev*; 53: 171-216.

- Gaucher, G., Dufresne, M.H., *et al.* (2005) Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release*; 109: 169-88.
- Giacalone, M.J., Gentile, A.M., *et al.* (2006) The use of bacterial minicells to transfer plasmid DNA to eukaryotic cells. *Cell Microbiol*; 8: 1624-33.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., *et al.* (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*; 35: 849-57.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., *et al.* (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*; 302: 415-9.
- Hadjichristidis, N., Pitsikalis, M., *et al.* (2001) Polymers with complex architecture by living anionic polymerization. *Chem Rev*; 101: 3747-92.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*; 418: 244-51.
- Hara, T., Aramaki, Y., *et al.* (1995) Receptor-mediated transfer of pSV2CAT DNA to mouse liver cells using asialofetuin-labeled liposomes. *Gene Ther*; 2: 784-8.
- Harada-Shiba, M., Yamauchi, K., *et al.* (2002) Polyion complex micelles as vectors in gene therapy--pharmacokinetics and in vivo gene transfer. *Gene Ther*; 9: 407-14.
- Harashima, H., Shinohara, Y., *et al.* (2001) Intracellular control of gene trafficking using liposomes as drug carriers. *Eur J Pharm Sci*; 13: 85-9.
- He, E., Yue, C.Y., *et al.* (2008) Polyplex formation between four-arm poly(ethylene oxide)-b-poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate) and plasmid DNA in gene delivery. *J Biomed Mater Res A*; 91A: 708-18.
- Heidel, J.D., Yu, Z., *et al.* (2007) Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc Natl Acad Sci*; 104: 5715-21.
- Hsieh, H.L., Quirk, R.p. (1996) Anionic polymerization: principles and practical application. *Marcel Dekker*; New York.

- Hughes, M.D., Hussain, M., *et al.* (2001) The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discov Today*; 6: 303-15.
- Hurtrez, G., Dumas, P., *et al.* (1998) Polystyrene-poly(ethylene oxide) diblock copolymers micelles in water. *Polymer Bulletin*; 40: 203-10.
- Jeong, J.H., Kim, S.H., *et al.* (2005) Polyelectrolyte complex micelles composed of c-raf antisense oligodeoxynucleotide-poly(ethylene glycol) conjugate and poly(ethylenimine): effect of systemic administration on tumor growth. *Bioconjug Chem*; 16: 1034-7.
- Kabanov, A.V., Kabanov, V.A. (1995) DNA Complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug Chem*; 6: 7-20.
- Kakizawa, Y., Kataoka, K. (2002) Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv Drug Deliv Rev*; 54: 203-22.
- Kakizawa, Y., Kataoka, K. (2002) Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv Drug Deliv Rev*; 54: 203-22.
- Kalota, A., Karabon, L., *et al.* (2006) 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (2'F-ANA) modified oligonucleotides (ON) effect highly efficient, and persistent, gene silencing. *Nucleic Acids Res*; 34: 451-61.
- Kano, A., Moriyama, K., *et al.* (2009) Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA. *J Control Release*.
- Kataoka, K. (2001) Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*; 47: 113-31.
- Kawakami, S., Higuchi, Y., *et al.* (2008) Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide. *J Pharm Sci*; 92: 726-45.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C., *et al.* (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*; 7: 33-40.
- Kim, S.H., Jeong, J.H., *et al.* (2005) Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine). *J Control Release*; 104: 223-32.

- Kim, S.H., Jeong, J.H., *et al.* (2008) Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J Control Release*; 129: 107-16.
- Kircheis, R., Blessing, T., *et al.* (2001) Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes. *J Control Release*; 72: 165-70.
- Kirpotin, D.B., Drummond, D.C., *et al.* (2006) Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*; 66: 6732-40.
- Kurreck, J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*; 270: 1628-44.
- Kursa, M., Walker, G.F., *et al.* (2003) Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem*; 14: 222-31.
- Lambert, G., Fattal, E., *et al.* (2001) Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*; 47: 99-112.
- Levy, A.P., Levy, N.S., *et al.* (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem*; 271: 2746-53.
- Li, C.X., Parker, A., *et al.* (2006) Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*; 5: 2103-9.
- Liu, Z., Zhanga, Z., *et al.* (2010) Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Prog Polym Sci*; 35: 1144-1162.
- Lok, C.N., Viazovkina, E., *et al.* (2002) Potent gene-specific inhibitory properties of mixed-backbone antisense oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinose and 2'-deoxyribose nucleotides. *Biochemistry*; 41: 3457-67.
- Lukyanov, A.N., Torchilin, V.P. (2004) Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev*; 56: 1273-89.
- MacDiarmid, J.A., Amaro-Mugridge, N.B., *et al.* (2009) Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nat Biotechnol*; 27: 643-51.

Maeda, H., Matsumura, Y. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*; 46: 6387-92.

Maeda, H., Wu, J., *et al.* (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*; 65: 271-84.

Mahmud, A., Xiong, X.B., *et al.* (2007) Polymeric micelles for drug targeting. *J Drug Target*; 15: 553-84.

Manoharan, M. (2004) RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol*; 8: 570-9.

Mastrobattista, E., van der Aa, M.A., *et al.* (2006) Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 115-21.

Matyjaszewski, K., Timothy, E.P. (1998) Atom transfer radical polymerization and the synthesis of polymeric materials. *Adv Mater*; 10: 901-15.

Matyjaszewski, T.E.P.a.K. (1998) Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials. *Adv Mater*; 10: 901-15.

McHutchison, J.G., Patel, K. (2002) Future therapy of hepatitis C. *Hepatology*; 36: 245-52.

McNamara, J.O., Andrechek, E.R., *et al.* (2006) Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*; 24: 1005-15

Medina-Kauwe, L.K., Xie, J., *et al.* (2005) Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther*; 12: 1734-51.

Merdan, T., Callahan, J., *et al.* (2003) Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug Chem*; 14: 989-96.

Merkel, O.M., Beyerle, A., *et al.* (2009) Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. *Mol Pharm*; 6: 1246-60.

- Mintzer, M.A., Simanek, E.E. (2009) Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev*; 109: 259-302.
- Mitsuyasu, R.T., Merigan, T.C., *et al.* (2009) Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nat Med*; 15: 285-92.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., *et al.* (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*; 53: 283-318.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N., *et al.* (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*; 77: 759-803.
- Niidome, T., Huang, L. (2002) Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther*; 9: 1647-52.
- Ogris, M., Wagner, E. (2002) Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. *Somat Cell Mol Genet*; 27: 85-95.
- Oishi, M., Nagarsugim, F., *et al.* (2005) Smart polyion complexe micelles for targeted Intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotides containing acid-Labile linkages. *Chembiochem*; 6.
- Pack, D.W., Hoffman, A.S., *et al.* (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*; 4: 581-93.
- Patil, Y., Panyam, J. (2009) Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *Int J Pharm*; 367: 195-203.
- Pintauer, T., Matyjaszewski, K. (2008) Atom transfer radical addition and polymerization reactions catalyzed by ppm amounts of copper complexes. *Chem Soc Rev*; 37: 1087-97.
- Pirollo, K.F., Rait, A., *et al.* (2003) Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol Ther*; 99: 55-77.
- Plank, C., Zatloukal, K., *et al.* (1992) Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem*; 3: 533-9.

- Ponka, P., Lok, C.N. (1999) The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 31: 1111-37.
- Praseuth, D., Guieysse, A.L., *et al.* (1999) Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. *Biochim Biophys Acta*; 1489: 181-206.
- Qian, Z.M., Li, H., *et al.* (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev*; 54: 561-87.
- Resina, S., Prevot, P., *et al.* (2009) Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy. *PLoS One*; 4: e6058.
- Roth, C.M., Sundaram, S. (2004) Engineering synthetic vectors for improved DNA delivery: insights from intracellular pathways. *Annu Rev Biomed Eng*; 6: 397-426.
- Rungsardthong, U., Deshpande, M., *et al.* (2001) Copolymers of amine methacrylate with poly(ethylene glycol) as vectors for gene therapy. *J Control Release*; 73: 359-80.
- Safinya, C.R. (2001) Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr Opin Struct Biol*; 11: 440-8.
- Scholzova, E., Malik, R., *et al.* (2007) RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett*; 246: 12-23.
- Shi, N., Pardridge, W.M. (2000) Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97: 7567-72.
- Song, E., Zhu, P., *et al.* (2005) Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*; 23: 709-17
- Sullenger, B.A., Gilboa, E. (2002) Emerging clinical applications of RNA. *Nature*; 418: 252-8.
- Swanson, J.A., Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*; 5: 424-8.
- Takae, S., Miyata, K., *et al.* (2008) PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *J Am Chem Soc*; 130: 6001-9.

- Tan, J.F., Too, H.P., *et al.* (2006) Aggregation behavior and thermodynamics of binding between poly(ethylene oxide)-block-poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate) and plasmid DNA. *Langmuir*; 22: 3744-50.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., *et al.* (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*; 4: 346-58.
- Tietze, N., Pelisek, J., *et al.* (2008) Induction of apoptosis in murine neuroblastoma by systemic delivery of transferrin-shielded siRNA polyplexes for downregulation of Ran. *Oligonucleotides*; 18: 161-74.
- Torchilin, V. (2010) Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*.
- Torchilin, V.P. (2005) Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. *Adv Drug Deliv Rev*; 57: 95-109.
- Torchilin, V.P. (2007) Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*; 24: 1-16.
- Torchilin, V.P. (2004) Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell Mol Life Sci*; 61: 2549-59.
- Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., *et al.* (2003) Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 6039-44.
- Ulrich, A.S. (2002) Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep*; 22: 129-50.
- Vasir, J.K., Reddy, M.K., *et al.* (2005) Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Curr Nanosci*; 1: 47-64.
- Vidal, L., Blagden, S., *et al.* (2005) Making sense of antisense. *Eur J Cancer*; 41: 2812-8.
- Vinogradov, S., Batrakova, E., *et al.* (1999) Polyion complex micelles with protein-modified corona for receptor-mediated delivery of oligonucleotides into cells. *Bioconjug Chem*; 10: 851-60.

- Wagner, E., Zenke, M., *et al.* (1990) Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87: 3410-4.
- Wang, J.-S., Matyjaszewski, k. (1995) Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J Am Chem Soc*; 117: 5614-5.
- Wattiaux, R., Laurent, N., *et al.* (2000) Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*; 41: 201-8.
- Weyermann, J., Lochmann, D., *et al.* (2004) Comparison of antisense oligonucleotide drug delivery systems. *J Control Release*; 100: 411-23.
- Wheeler, C.J., Sukhu, L., *et al.* (1996) Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA-cytofectin complexes. *Biochim Biophys Acta*; 1280: 1-11.
- Wheeler, J.J., Palmer, L., *et al.* (1999) Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene Ther*; 6: 271-81.
- Whitehead, K.A., Langer, R., *et al.* (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*; 8: 129-38.
- Wilds, C.J., Damha, M.J. (2000) 2'-Deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleosides and oligonucleotides (2'F-ANA): synthesis and physicochemical studies. *Nucleic Acids Res*; 28: 3625-35.
- Wolff, J.A., Lederberg, J. (1994) An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther*; 5: 469-80.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., *et al.* (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*; 247: 1465-8.
- Wong, S.Y., Pelet, J.M., *et al.* (2007) Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future. *Prog Polym Sci*; 32: 799-837.
- Wright, L., Kearney, P. (2001) Current status of ribozymes as gene therapy agents for cancer. *Cancer Invest*; 19: 495-509.

- Wu, G.Y., Wu, C.H. (1988) Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem*; 263: 14621-4.
- Xia, K.M.a.J. (2001) Atom transfer radical polymerization. *Chem Rev*; 101: 2921-90.
- Yessine, M.A., Dufresne, M.H., *et al.* (2007) Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles. *Bioconjug Chem*; 18: 1010-4.
- Yessine, M.A., Leroux, J.C. (2004) Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*; 56: 999-1021.
- Yessine, M.A., Meier, C., *et al.* (2006) On the role of methacrylic acid copolymers in the intracellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm*; 63: 1-10.
- Young, R.N., Quirk, R.P., *et al.* (1984) Anionic polymerizations of non-polar monomers involving lithium *J Advances in Polymer Science*; 56.
- Yu, B., Zhao, X., *et al.* (2009) Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS J*; 11: 195-203.
- Zamaratski, E., Pradeepkumar, P.I., *et al.* (2001) A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J Biochem Biophys Methods*; 48: 189-208.
- Zamecnik, P.C., 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: 280-4.
- Zamore, P.D. (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol*; 8: 746-50.
- Zubin, E.M., Romanova, E.A., *et al.* (1999) Oligonucleotide-peptide conjugates as potential antisense agents. *FEBS Lett*; 456: 59-62.

6. HYPOTHÈSES DE RECHERCHE & OBJECTIFS

Objectifs généraux

Des travaux antérieurs ont montré que des PICMs préparées à partir de dérivés de méthacrylate de poly(aminoalkyle) seraient des candidats potentiels pour la vectorisation d'acides nucléiques (Dufresne *et al.* 2008). Par ailleurs, les résultats de Yessine *et al.* (2007) ont révélé que le (P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) assurait une déstabilisation de la membrane endosomale à la suite d'un changement de conformation lors de l'acidification du milieu. Conséquemment, la combinaison de ces deux stratégies en un seul système, des micelles dites ternaires, promet un fort potentiel pour la vectorisation et l'administration d'ON. De plus, la conjugation d'une molécule de reconnaissance pourrait favoriser l'internalisation cellulaire du vecteur et consoliderait d'avantage l'efficacité du vecteur. L'objectif principal du présent mémoire était de mettre au point des PICMs ternaires présentant des fragments d'anticorps à leur surface (anti-CD71 ; fragment dirigé contre les récepteurs à la transferrine) pour le transport de divers ONs.

À cette fin, des copolymères cationiques composés d'un bloc de PEG (3000 g/mol, 68 unités de répétition) et d'un bloc dérivé de méthacrylate poly(aminoéthyle) (25 unités de répétition, amines primaires, tertiaires ou les deux) ont été synthétisés. Le choix de cette composition repose sur une étude évaluant la composition optimale des copolymères cationiques menée préalablement au sein de notre laboratoire. En ce qui concerne le segment de PEG, il a été démontré que des PICMs possédant une chaîne de PEG de 2000 g/mol présentaient une plus grande stabilité face à la dissociation que celles préparées avec un PEG de 5000 g/mol ou de 3000 g/mol, mais qu'une tendance inverse était observée au niveau de la taille des PICMs : une diminution de la taille des PICMs était observée avec une augmentation de la longueur de la chaîne de PEG (Dufresne *et al.* 2008). Cette même étude avait également démontré que le nombre d'unités monomériques de méthacrylate poly(aminoéthyle) optimal, en terme de taille et d'IP des micelles obtenues, se situait entre 20 et 30 (Dufresne *et al.* 2008). Trois copolymères cationiques ont donc été préparés pour la suite de ce projet, soit le poly(éthyle glycol)_{68-bloc}-(méthacrylate de poly(aminoéthyle))₂₄

(PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄), le poly(éthyle glycol)₆₈-*bloc*-méthacrylate de poly(diméthylaminoéthyle)₂₅ (PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅) et le poly(éthyle glycol)₆₈-*bloc*-(méthacrylate de poly(aminoéthyle))₁₁-*co*-(méthacrylate de diméthylaminoéthyle))₁₃ (PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₁-*co*-DMAEMA₁₃)).

Dans un second temps, des PICMs ont été formées avec du matériel génétique, en présence ou non de copolymère membrano-lytique. L'incorporation d'ON-PS, de FANA ou de pARNi au sein du vecteur ont permis d'étudier la versatilité du système et l'influence de chacune des composantes, polymérique ou génétique, sur les propriétés physicochimiques des PICMs obtenues. Finalement, le système a été complété par l'ajout d'un élément de ciblage actif, le fragment Fab' de l'anticorps anti-CD71 dirigé contre les récepteurs à la transferrine. La conjugaison d'un fragment Fab' plutôt que de l'anticorps complet permet de réduire le masse moléculaire, et donc l'encombrement stérique de l'élément de ciblage, ce qui est particulièrement important pour ces systèmes nanométriques. En effet, la conjugaison d'un anticorps complet pourrait nuire à la formation spontanée des PICMs (Chapman 2002).

Objectifs spécifiques

Ce travail de recherche comporte quatre objectifs spécifiques :

1. Synthétiser et caractériser une librairie de copolymères cationiques à base de monomères de méthacrylate de poly(aminoalkyle) (nombre d'unités monomériques variant entre 20 et 30) et de PEG (68 unités de répétition, $M_n = 3000$ g/mol).
2. Mettre au point la préparation de PICMs à partir d'ON-PS, de FANA et de pARNi, en présence ou non d'un copolymère membrano-lytique, et caractériser leurs propriétés physicochimiques.
3. Élaborer une stratégie de couplage afin de conjuguer un fragment d'anticorps (Fab') au copolymère cationique;

4. Préparer des PICMs décorées d'une molécule de reconnaissance à leur surface (Fab' anti-CD71) et évaluer l'efficacité d'internalisation de ces immunomicelles *in vitro*.

CHAPITRE II. RÉSULTATS & DISCUSSION

1. SYNTHÈSE DES POLYMÈRES CATIONIQUES

Le premier objectif de ce projet était de préparer et caractériser une librairie de copolymères cationiques d'AEMA et de DMAEMA. À cette fin, la PRTA a été utilisée pour la préparation des copolymères puisque cette méthode de polymérisation conduit à la préparation de copolymères de composition et d'architecture bien définies (figure 2.1). Afin d'alléger la lecture du présent manuscrit, tous les détails expérimentaux seront présentés au chapitre IV.

Un PEG de 3000 g/mol a été sélectionné en tant que segment hydrophile neutre dans la préparation des copolymères cationiques puisque cette longueur confère des propriétés intermédiaires aux micelles en terme de taille et de stabilité face à la dissociation (Dufresne *et al.* 2008). Le MeO-PEG-OH est dans un premier temps converti en macroamorceur de la PRTA, le α -(2-bromoisobutyrylate)- ω -méthyle PEG (MeO-PEG-Br). Ce dernier est obtenu par une substitution nucléophile du MeO-PEG-OH sur le bromure de 2-bromoisobutyryle dans le THF en présence de triéthylamine sous conditions anhydres (Ranger 2001) (figure 2.1 a). Afin d'assurer la déprotonation efficace de l'alcool, le MeO-PEG-OH a été préalablement déshydraté par évaporation isotrope de l'eau et du toluène. La conversion du MeO-PEG-OH en macroinitiateur a été confirmée par résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN) par l'apparition du signal correspondant aux groupements méthyle du 2-bromoisobutyrate présent à 1,9 ppm.

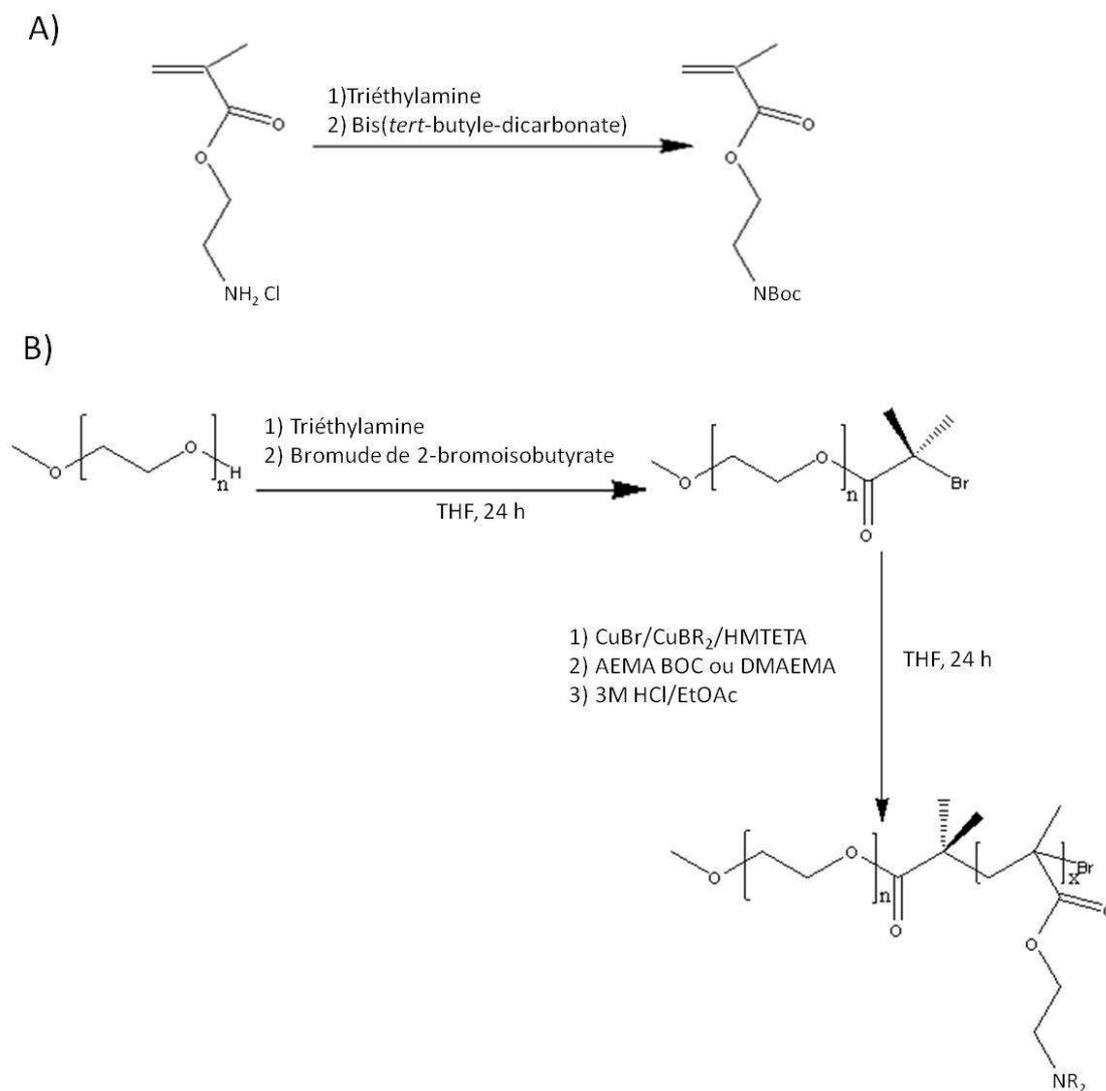


Figure 2.1. Voies de synthèse utilisées pour la préparation du copolymère cationique par PRTA (A) et pour la protection de l'amine primaire par le bis(*tert*-butyle dicarbonate) (Boc_2O) afin de former le méthacrylate de 2-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)aminoéthyle (AEMABoc) (B) (où R est soit un H ou une chaîne alkyle).

Dans un deuxième temps, la polymérisation est amorcée suite à l'oxydation de cuivre par le macroinitiateur bromé (MeO-PEG-Br), ce qui entraîne la formation d'un agent de transfert réversible comportant un radical libre, le MeO-PEG^{*}, et d'un complexe

organométallique de degré d'oxydation supérieur. La phase de propagation se fait par échange de radicaux entre l'espèce vivante (MeO-PEG•) et le monomère méthacrylate, soutenant la croissance de la chaîne de copolymère. Dans le cadre des présents travaux, un ligand tétradentate, le 1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine (HMTETA) a été utilisé afin d'ajuster le potentiel redox du Cu(I) et de contrôler la vitesse de propagation en limitant la concentration en radicaux libres dans le système (Xia 2001). De même, l'ajout de Cu(II) au milieu réactionnel assure également une réduction de la concentration en radicaux libres *via* l'effet radicalaire persistant (ERP) (Fischer 2001). L'ERP provoque un effet d'autorégulation de la polymérisation (Fischer 2001). Les radicaux persistants stables (*i.e* X-Cu(II) (où X est un halogène); figure 1.16) ont la propriété de ne pas réagir entre eux (réaction terminaison), et donc leurs concentrations augmentent progressivement dans le milieu réactionnel pendant que la concentration en radicaux actifs (*i.e*. Cu(I)) diminue, ce qui a pour effet de déplacer l'équilibre ($K_{act}/K_{désact}$) vers les espèces dormantes et de minimiser les réactions de terminaison (Fischer 2001, Tang *et al.* 2006). Par conséquent, l'addition de Cu(II) au milieu réactionnel a pour effet de maintenir une concentration en espèces radicalaires persistantes supérieure à celle des radicaux actifs, ce qui permet de ralentir la réaction de propagation comparativement à la réaction d'amorçage (Matyjaszewski 1998).

Les protocoles de polymérisation à partir des monomères d'AEMA et de DMAEMA nécessitent des précautions particulières. Par exemple, il a été démontré que les amines primaires peuvent entrer en compétition avec le ligand et induire son déplacement du complexe métal/ligand ou bien réagir avec le groupement halogène du macroinitiateur et mettre fin à la polymérisation (Xia 2001). Selon les conditions de réaction employées, la protection des amines primaires des monomères d'AEMA est généralement requise afin d'éviter leurs interférences durant la polymérisation. Notre laboratoire a donc mis au point une approche consistant à protéger l'amine primaire par un groupement protecteur, le Boc, préalablement à sa polymérisation. Cette étape de protection est réalisée en présence de Boc₂O dans le THF (Dufresne et Leroux 2004) (figure 2.1 b). Ainsi, la synthèse du

copolymère d'AEMA requiert une étape finale de déprotection des groupements amine en milieu acide, dans un mélange 3M HCl/EtOAc. La déprotection est confirmée par la disparition du signal du *tert*-butyle à 1,4 ppm en ^1H RMN.

D'autres voies de synthèse ont été proposées pour les polymères comportant des amines primaires. Par exemple, He *et coll.*(2007) ont mis au point une approche permettant la copolymérisation directe des monomères à base d'amine primaire par PRTA et RAFT (He *et al.* 2007, Read *et al.* 2010). Une série d'homopolymères d'AEMA et de copolymères de PEG-*b*-PAEMA de faibles IP (~ 1,1-1,4) ont été préparés avec succès par ces deux approches. Par ailleurs, l'utilisation de cuivre dans la synthèse des copolymères par PRTA a généré certaines inquiétudes face à leur sécurité pour des applications chez l'humain. Dans cette optique, Dong et Matyjaszewski (2008) ont réalisé la polymérisation du DMAEMA par PRTA en présence d'activateurs auto-regénérés par transfert d'électron, tels que le complexe étain(II) 2-éthylhexanoate ou l'acide ascorbique. Cette approche ne nécessite pas de dégazer le milieu réactionnel, réduit la quantité de cuivre utilisée de plus de mille fois et permet de préparer des polymères de DMAEMA dont l'IP est inférieur à 1,35 (Dong et Matyjaszewski 2008).

1.1. Synthèse d'une banque de polymères

Une banque de copolymères cationiques d'AEMA et/ou de DMAEMA ayant entre 20 et 30 unités de répétition a été préparée par PRTA (tableau 2.1). La composition des copolymères a été déterminée par ^1H RMN, par analyse élémentaire et par chromatographie d'exclusion stérique (CES).

Tableau 2.1. Banque de copolymères cationiques préparés et leur caractérisation.

Composition ^a		¹ H RMN (D ₂ O)		Analyse Élémentaire	CES ^c			Théorique ^d	
AEMA	DMAEMA	M _n (g/mol)	Densité d'amines ^b (mol/g) x 10 ³	Densité d'amines ^b (mol/g) x 10 ³	M _n	M _p	IP	Ionisés M _n (g/mol)	Non ionisés M _n (g/mol)
	20	7000	2,83	2,76				7000	6300
	22	7400	2,95	2,73	6100	5500	1,11	7400	6600
	23	7800	3,06	2,96	7500	7400	1,01	7600	6800
	24	7800	3,06	2,94	6400	6000	1,06	7800	6900
	25	8100	3,12	3,04	6300	6000	1,05	8000	7100
	26	8200	3,16	2,99	6400	5700	1,13	8200	7200
	28	8600	3,25	3,16	6800	6200	1,10	8600	7600
	31	9200	3,37	3,18				9200	8000
	21	6700	3,15	3,02	5200	6100	1,18	6600	7400
	24	7200	3,36	3,23	7100	7700	1,09	7100	8000
	29	8000	3,77	3,60	6100	7400	1,21	8000	9000
	8	5600	2,47	2,46	5300	5300	1,01	5600	5700
	10	6400	2,82	3,35	6700	7200	1,07	6400	6400
	13	7600	3,19	3,14	6400	6900	1,07	7400	7500
	14	8200	3,41	3,27	7500	8300	1,10	8100	8200
	15	7700	3,23	3,15	7000	6900	1,01	7600	7700
	15	8700	3,55	3,38				8600	8500

^a AEMA : aminoéthyle méthacrylate, DMAEMA : diméthyleaminoéthyle méthacrylate

^b La densité d'amine déterminée par ¹H RMN représente le rapport de moles d'unités monomériques sur l'inverse de la M_n. La densité d'amine déterminée par analyse élémentaire est obtenue en divisant la composition massique en azote (*p/p* %) par la masse molaire (MM) de l'azote (MM= 14 g/mol). Les calculs sont basés sur l'hypothèse que les polymères isolés sont complètement ionisés (MM_{AEMA}⁺ Cl⁻ = 166,6 g/mol et MM_{DMAEMA}⁺ Cl⁻ = 193,7 g/mol).

^c La caractérisation par CES des copolymères d'AEMA a été effectuée sur la forme protégée des copolymères, soit ceux contenant l'AEMABoc.

^d Les calculs théoriques sont basés sur l'hypothèse que les polymères isolés sont complètement ionisés ou non ionisés (MM_{AEMABoc} = 201,3 g/mol et MM_{DMAEMA} = 157,2 g/mol)

Le profil d'élution des copolymères par CES se caractérise par une distribution unimodale du poids moléculaire (IP < 1,2) ainsi qu'un déplacement du pic du macroinitiateur à des masses moléculaires plus élevées, ce qui confirme la synthèse d'un copolymère bloc. Des IP faibles, typiques de la synthèse par PRTA, ont été obtenus pour l'ensemble des copolymères cationiques. Le nombre d'unités monomériques composant les copolymères a été estimé par le ratio des signaux des groupements méthylène des monomères cationiques AEMA et DMAEMA (4,2 ppm; 2 H ou 2,6 ppm; 2 H, respectivement) en fixant l'intégration des groupements méthylène de l'unité de répétition du PEG (3,6 ppm; 272 H). La figure 2.2 présente un spectre ¹H RMN typique obtenu pour le copolymère PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄.

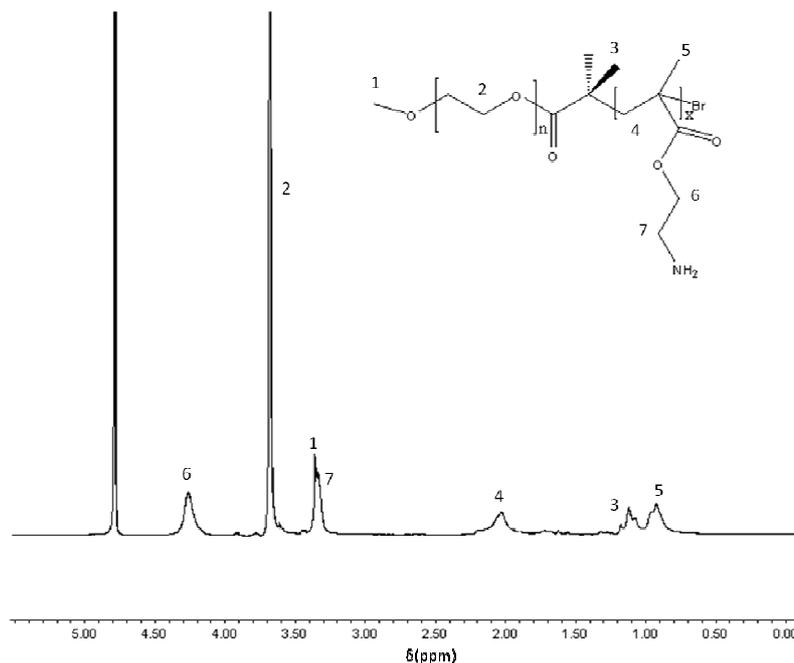


Figure 2.2. Spectre ¹H RMN du PEG₆₈-b-PAEMA₂₄

La densité d'amines calculée par ¹H RMN a été corroborée par analyse élémentaire. Néanmoins, les résultats de cette seconde technique diffèrent légèrement de ceux déterminés par ¹H RMN. Cette divergence de résultats pourrait s'expliquer par le fait que la présence de trace d'eau affecte l'analyse élémentaire du copolymère ce qui se traduit par une sous-estimation de la proportion massique d'azote et de la densité d'amine comparativement à celle déterminée par ¹H RMN. Cette différence peut également provenir de l'incertitude entourant l'intégration des signaux de PEG et des monomères sur leur spectre ¹H RMN ainsi que par le réel degré d'ionisation du copolymère. En effet, la densité d'amines du copolymère est calculée en assumant l'ionisation complète du copolymère cationique, ce qui tend à surestimer la densité d'amine. Cette hypothèse explique également la légère différence observée entre les M_n estimés par ¹H RMN et ceux obtenus par CES.

De cette banque, trois copolymères cationiques ont été sélectionnés pour la suite du projet: le PEG₆₈-b-PAEMA₂₄, le PEG₆₈-b-PDMAEMA₂₅ et le PEG₆₈-b-P(AEMA₁₃-co-

DMAEMA₁₁). Cette sélection repose sur une étude menée par Dufresne *et al.* (2008) qui a démontré que les propriétés physicochimiques des micelles sont optimales à un ratio monomère cationique/oxyde d'éthylène inférieur à 0,44, soit une densité d'amines inférieure à $3,70 \times 10^{-3}$ mol/g pour une chaîne de PEG de 3000 g/mol. Les différentes caractéristiques de ces trois polymères sont reportées dans le tableau 2.2.

1.2. Synthèse des polymères utilisés dans la préparation des micelles

Afin d'évaluer la charge réelle portée par les copolymères lors de la formation des micelles, le degré d'ionisation (α) et le pK_a des copolymères ont été déterminés par titrage potentiométrique. D'après son degré d'ionisation ($\alpha = 0,33$), le PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ présente, à pH 7.4, une densité de charge plus importante que le PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₄ ($\alpha = 0,22$), ce qui pourrait se traduire par la formation de micelles plus stables. Selon une étude menée par Jin *et al.* (2005), l'augmentation de la densité de charge portée par le polymère permet d'accroître la stabilité des complexes formés avec un ON. En effet, la quaternisation de l'amine tertiaire du DMAEMA leur a permis d'augmenter la stabilité de polyplexes formés avec un ON. Ces résultats renforcent l'hypothèse que la densité de charge supérieure du copolymère d'AEMA, comparativement au DMAEMA, pourrait lui conférer une meilleure capacité d'interaction avec l'ON et ainsi augmenter la stabilité des micelles formées. Pour sa part, le PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) ($\alpha = 0,31$) présenterait des propriétés intermédiaires en terme de stabilité entre les copolymères d'amines primaires et d'amines tertiaires.

Le titrage potentiométrique montre que le pK_a du PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ ($pK_a \sim 6,54$) est légèrement inférieur à celui du PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) ($pK_a \sim 6,80$) et du PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ ($pK_a \sim 6,89$) ce qui est en accord avec le caractère plus basique des amines tertiaires. Comparativement, les pK_a moyens des homopolymères de PDMAEMA et de PAEMA sont de 7,4 et de 7,5 respectivement (van de Wetering *et al.* 1999, Thompson *et al.* 2008), soit 1,06 et 0,61 unité de pK_a de plus que nos copolymères de

PEG. Cette différence est d'autant plus importante lorsque le pK_a du PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ est comparé à celui du monomère DMAEMA ($pK_a \sim 8,3$) (van de Wetering *et al.* 1999). Tel que rapporté pour la première fois par Prádný *et al.* (1987), cette diminution du pK_a est attribuée à la variation du degré d'ionisation des groupements amines en fonction de leur microenvironnement. En effet, la proximité de plusieurs fonctions amines aurait pour effet de diminuer le pK_a et de déplacer l'équilibre acido-basique vers la neutralité. Ce phénomène a également été mis en évidence par Van de Wetering *et al.* (1999) qui ont rapporté une diminution du pK_a de divers dérivés homopolymère de méthacrylate d'amino(alkyle) et de méthacrylamide comparativement à leur monomères respectifs.

Tableau 2.2. Caractérisation des copolymères cationiques sélectionnés

Copolymères ^a	CES ^b			¹ H RMN		Analyse élémentaire		Titrage potentiométrique	
	Masse molaire			M _n ^c	Densité d'amines ^c (mol/g) x 10 ³	Azote (% p/p)	Densité d'amines ^c (mol/g) x 10 ³	pKa ($\alpha = 0,5$)	Degré Ionisation pH 7,4
	M _n	M _p	IP						
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄	7100	7700	1,05	7200	3,36	4,52	3,23	6,89	0,33
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅	6300	6000	1,05	8100	3,12	4,26	3,04	6,54	0,22
PEG ₆₈ - <i>b</i> -P(AEMA ₁₃ - <i>co</i> -DMAEMA ₁₁)	6400	6900	1,07	7600	3,19	4,39	3,14	6,80	0,31

^aLes copolymères sont représentés comme suit : PEG_x-*b*-P(AEMA_y-*b*-DMAEMA_z) où x représente le nombre d'unités de répétition de la chaîne de PEG, y le nombre d'unités de répétition AEMA et z le nombre d'unités de répétition DMAEMA.

^bLa caractérisation par CES des copolymères d'AEMA a été effectuée sur la forme protégée des copolymères, soit ceux contenant l'AEMABoc.

^cLa densité d'amine déterminée par ¹H RMN représente le rapport de moles d'unités monomériques sur l'inverse de la M_n. La densité d'amine déterminée par analyse élémentaire est obtenue en divisant la composition massique en azote (p/p %) par la masse molaire (MM) de l'azote (MM= 14 g/mol). Les calculs sont basés sur l'hypothèse que les polymères isolés sont complètement ionisés (MM_{AEMA⁺Cl⁻} = 166,6 g/mol et MM_{DMAEMA⁺Cl⁻} = 193,7 g/mol).

^dLe degré d'ionisation représente le ratio d'amines protonées à pH 7,4 sur le nombre total d'amines contenues dans le copolymère.

L'analyse de la courbe de titrage des trois copolymères révèle également la présence d'un plateau autour de la neutralité, soit entre un pH de 6 et 8, ce qui confirme le caractère tampon de ces copolymères cationiques (figure 2.3). Ce caractère tampon serait responsable du potentiel endosomolytique des copolymères dérivés de méthacrylate d'amino(alkyle) selon un mécanisme d'« éponge à proton », comparable à celui attribué au PEI et PAMAM (van de Wetering *et al.* 1999). Toutefois, de récentes études ont suggéré que la capacité tampon du PDMAEMA est insuffisante pour induire une déstabilisation de la membrane endosomale (Won *et al.* 2009, You et Auguste 2010). En effet, You et Auguste (2010) ont démontré que la capacité tampon du PDMAEMA diminuait significativement lorsque le pH était inférieur à 6,0. Conséquemment, le pouvoir tampon du polyplexe de PDMAEMA/ON ne serait optimal qu'au début de la formation du compartiment endosomal, soit avant la formation de l'endosome mature, et le polyplexe ne posséderait qu'une courte période de temps pour s'échapper de l'organelle cellulaire (You et Auguste 2010). Par ailleurs, Jones *et al.* (2004) ont montré que le PDMAEMA induit un changement dans la morphologie du compartiment endosomal/lysosomal à la suite de l'internalisation cellulaire de complexes de PDMAEMA/ON mais ne déstabilise pas physiquement la membrane endosomale. Conséquemment, l'addition d'un copolymère endosomolytique au vecteur, tel que le P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀), est essentielle afin d'assurer la libération du vecteur et de sa cargaison vers le cytoplasme de la cellule.

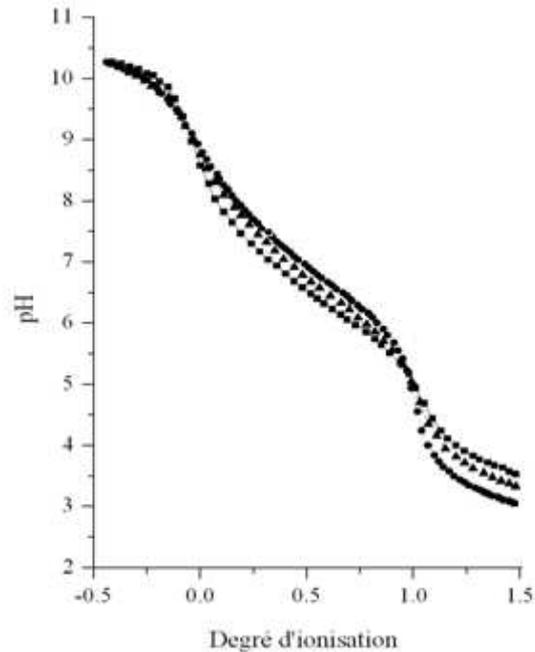


Figure 2.3. Titrage potentiométrique des copolymères $\text{PEG}_{68}\text{-}b\text{-PAEMA}_{24}$ (■), $\text{PEG}_{68}\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{25}$ (●) et $\text{PEG}_{68}\text{-}b\text{-P(AEMA}_{13}\text{-}co\text{-DMAEMA}_{11})$ (▲).

2. PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES MICELLES POLYMÈRES

Le deuxième objectif de ce projet était de mettre au point la préparation de PICMs incorporant ou non un copolymère anionique ayant la capacité de déstabiliser la membrane endosomale, soit le $\text{P(MAA}_{50}\text{-}co\text{-EA}_{40}\text{-}co\text{-BMA}_{10})$ (Yessine *et al.* 2003). À cette fin, les propriétés physicochimiques de PICMs ternaires (composées de copolymère cationique/ON/copolymère anionique) ont été étudiées et comparées à celle de PICMs binaires (composées de copolymère cationique/ON). L'addition du $\text{P(MAA}_{50}\text{-}co\text{-EA}_{40}\text{-}co\text{-BMA}_{10})$ aux micelles permet de conférer un caractère pH-sensible au système et de promouvoir la déstabilisation de la membrane endosomale. Ainsi, en milieu acide, la protonation des groupements d'acide carboxylique du $\text{P(MAA}_{50}\text{-}co\text{-EA}_{40}\text{-}co\text{-BMA}_{10})$ induit un changement de conformation au copolymère. Ce dernier passe d'une structure linéaire à

globulaire hydrophobe ce qui causerait la dissociation des micelles et déstabiliserait la bicouche lipidique de la membrane endosomale (figure 2.4) (Yessine *et al.* 2007).

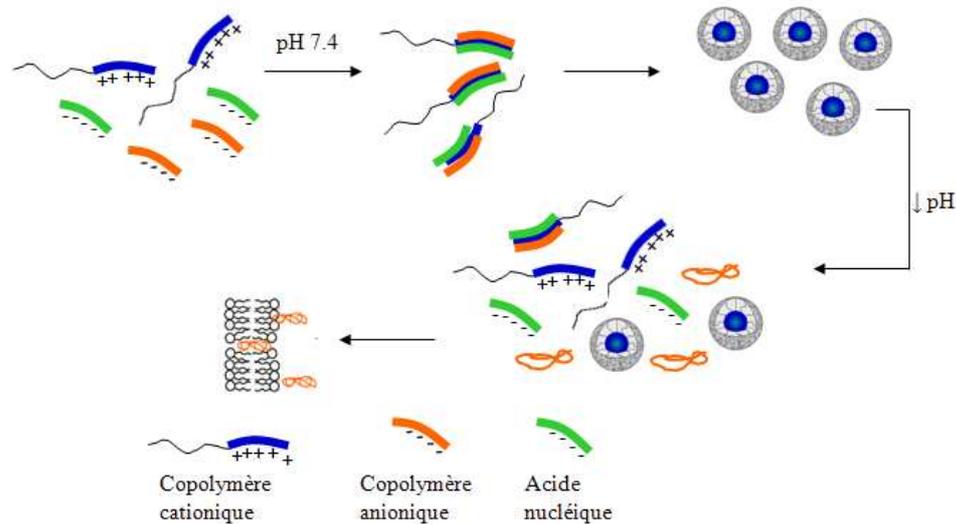


Figure 2.4. Formation des micelles polyioniques ternaires et mécanisme de libération du matériel génétique. Schéma adapté de Yessine *et al.* (2007).

Le ratio molaire azote/phosphate (N/P) est l'un des paramètres critiques affectant les propriétés physicochimiques des PICMs. Dans le cas des PICMs ternaires, le ratio se définit par $N/(P+COOH)$, soit le rapport molaire des amines du copolymère cationique sur la somme des phosphates de l'ON et des acides carboxyliques du copolymère P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀). Ainsi, le ratio idéal représente la proportion molaire en copolymère cationique et en polyanion qui permet d'obtenir (1) des propriétés physicochimiques optimales, *i.e.* un IP minimal, une intensité maximale de la diffusion de la lumière et un petit diamètre hydrodynamique, (2) une incorporation complète du matériel génétique au sein du vecteur et, (3) une haute stabilité colloïdale des complexes. Les propriétés physicochimiques des PICMs binaires et ternaires en termes de tailles, IP, stabilité et taux d'incorporation de l'acide nucléique ont été évaluées en fonction des ratios N/P et N/(P+COOH), respectivement. Dans le cadre de cette étude, l'ON modèle utilisé dans la préparation des complexes était l'ON ISIS 3521, un ON-PS antisens de 20 paires de bases

dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine kinase C-alpha (PKC- α) des cellules tumorales (cancer de la prostate, des poumons et des seins) (Dean *et al.* 1994, Geiger *et al.* 1998).

2.1. Micelles binaires

Le ratio N/P idéal pour des PICMs binaires, soit des micelles composées uniquement du copolymère cationique et de l'ON, a été dans un premier temps établi pour chacun des copolymères cationiques. À cette fin, une quantité croissante de copolymère cationique a été ajoutée à une solution d'ON et les propriétés colloïdales des micelles ont été mesurées par diffusion de la lumière en mode dynamique (DLD) après chaque addition. La figure 2.5 présente la variation des propriétés colloïdales des micelles en fonction du ratio N/P pour chacun des copolymères cationiques. Le ratio N/P idéal a été évalué à 1,5 pour les trois copolymères cationiques. À ce ratio, des micelles de petite taille (entre 35 et 65 nm), de distribution monomodale ($IP < 1,3$) et d'intensité de la lumière diffusée maximale ont été obtenues. Plus particulièrement, les micelles d'AEMA présentent une taille supérieure aux micelles de DMAEMA, ce qui suggère que la nature du groupement amine influence les interactions avec l'ON. Ceci peut s'expliquer par la présence de ponts hydrogène supplémentaires entre l'amine primaire et l'acide nucléique qui renforceraient l'interaction entre l'AEMA et l'ON ce qui augmenterait l'hydrophobie des chaînes neutralisés et conduirait à la formation de micelles de rayon hydrodynamique plus grand. À l'inverse, la présence des groupements méthyle sur l'amine tertiaire encombrerait l'interaction entre le DMAEMA et l'ON. De plus, l'intensité de diffusion maximale observée à ce ratio suggère que toutes les chaînes de copolymères participent à la formation des micelles et qu'un nombre maximal de complexes est formé, ou que les micelles formées ont une taille plus importante. Par exemple, l'augmentation d'intensité de la lumière diffusée des micelles de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ corrobore avec une augmentation des tailles des complexes en fonction du ratio N/P. En effet, la neutralisation progressive des charges par l'ON induit une augmentation de l'hydrophobicité du AEMA et donc, de la taille des complexes résultants.

Ces résultats sont en accord avec les études plus exhaustives précédemment publiées par Dufresne *et al.*(2008).

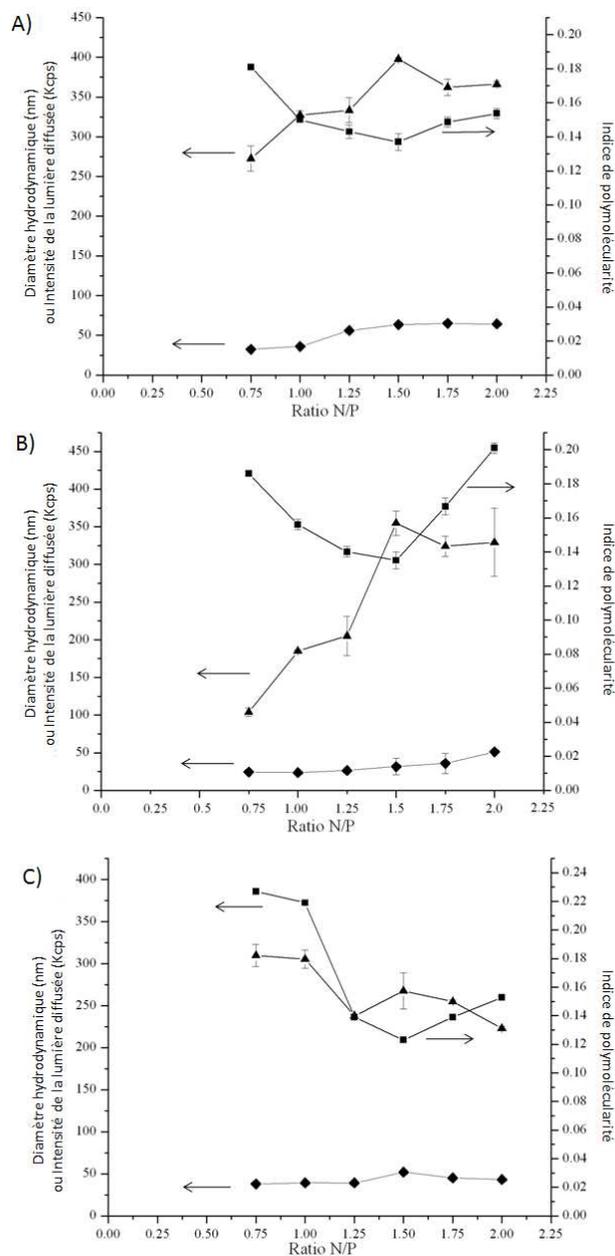


Figure 2.5. Effet du ratio molaire N/P sur le diamètre hydrodynamique moyen (♦), l'intensité de la lumière diffusée (▲) et l'IP (■) de micelles binaires de (A) PEG₆₈-b-PAEMA₂₄, (B) PEG₆₈-b-PDMAEMA₂₅, (C) PEG₆₈-b-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁). Moyenne ± ET (n=3).

2.2. Micelles ternaires

Un ratio N/COOH préliminaire a été d'abord déterminé en absence d'ON par la formation de micelles binaires entre les copolymères cationiques et le P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀). Une quantité croissante du copolymère P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) a été ajoutée à une solution de copolymère cationique et l'intensité de la lumière diffusée, l'IP et le diamètre hydrodynamique des micelles ont été mesurés par DLD après chaque addition. Un profil représentatif obtenu pour le polymère PEG_{68-b}-PAEMA₂₄ est présenté à la figure 2.6. Tel qu'observé pour les micelles binaires de copolymère cationique/ON, une intensité maximale et un IP minimal sont observés en fonction d'une augmentation du ratio N/COOH. Ainsi, les ratios N/COOH idéaux ont été établis à 1,3 pour les micelles de PEG_{68-b}-AEMA₂₄, à 1,5 pour les micelles de PEG_{68-b}-PDMAEMA₂₅ et 1,4 pour les micelles de PEG_{68-b}-P(AEMA_{13-co}-DMAEMA₁₁) (figure 2.7). Contrairement aux PICMs binaires de copolymère cationique/ON, dont les tailles varient selon la nature du copolymère cationique (entre 65 et 35 nm) (figure 2.7 a), les micelles de copolymère cationique/P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) présentent des tailles constantes, inférieures à ~ 23 nm (figure 2.7 b). Ces résultats pourraient s'expliquer par une plus forte interaction entre les copolymères cationiques et le P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) comparativement à l'ON ce qui se traduirait par une condensation plus efficace et un cœur hydrophobe plus dense. Cette différence d'interaction résulterait, en partie, de la contribution additionnelle des blocs d'EA et de BMA à l'hydrophobie du P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) et à la condensation du cœur de la micelle. De plus, à un pH physiologique, le copolymère de P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) ($pK_a = 7,3$; $\alpha = 40$ %) et les copolymères cationiques de DMAEMA et/ou d'AEMA ne sont que partiellement ionisés de sorte que des liaisons hydrogènes entre les fonctions amine et acide carboxylique seraient également impliqués dans la formation des complexes. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Feldstein *et al.* (2009), qui ont étudié le mécanisme d'interaction intermoléculaire de complexes de P(DMAEMA-co-méthylméthacrylate (MMA)-co-BMA) et de P(MAA-co-EA). Ces travaux ont mis en évidence la participation de liaisons hydrogène entre le DMAEMA et le PMAA dans la formation du polyplexe.

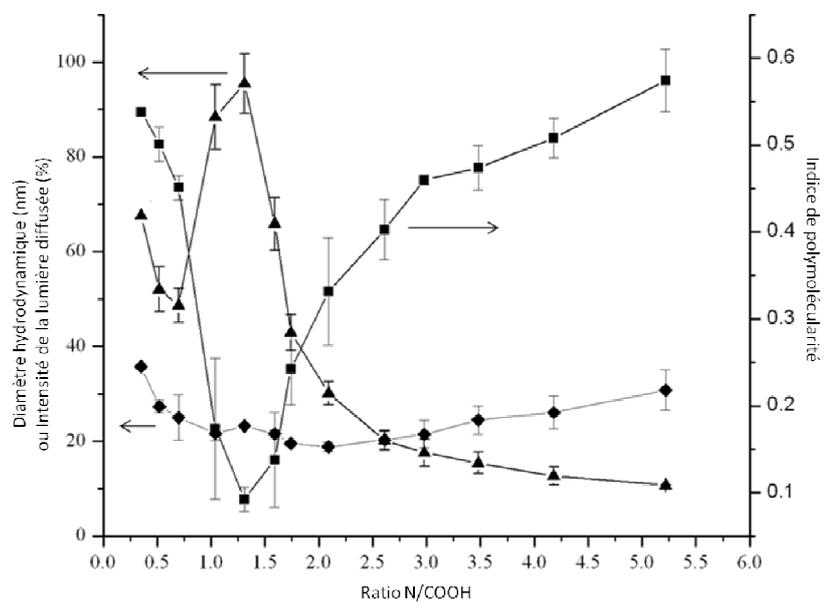


Figure 2.6. Effet du ratio molaire N/COOH sur le diamètre hydrodynamique moyen (◆), l'intensité de la lumière diffusée (▲) et l'IP (■) de micelles de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄/P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀). Moyenne ± ET (n=3).

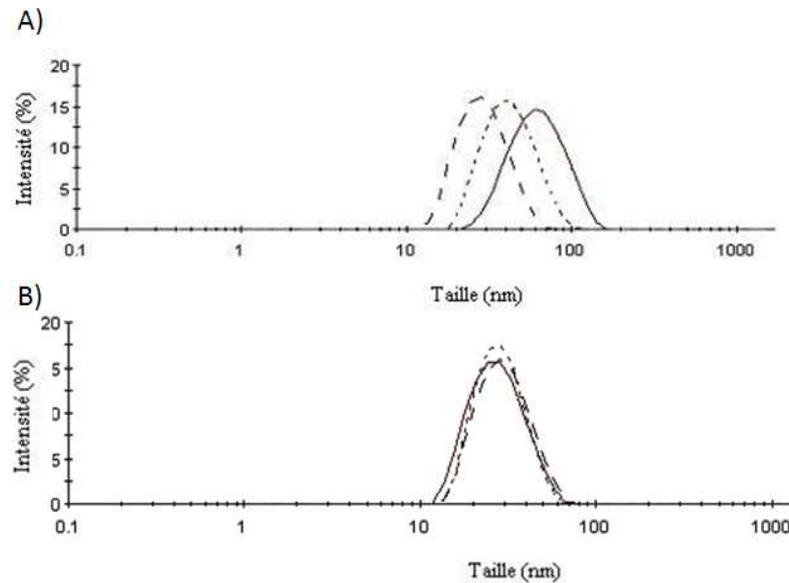


Figure 2.7. Distribution moyenne du diamètre hydrodynamique de micelles binaires de PEG₆₈-b-PAEMA₂₄ (—), PEG₆₈-b-PDMEAEMA₂₅ (- - -), PEG₆₈-b-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁) (·····) avec ON (A) ou avec le copolymère P(MAA₅₀-co-EA₄₀-co-BMA₁₀) (B). Les micelles ont été préparées à leurs ratios N/P et N/COOH idéaux respectifs.

Les micelles ternaires ont été obtenues en ajoutant de l'ON aux micelles de copolymère cationique/P(MAA₅₀-co-EA₄₀-co-BMA₁₀) préformulées à leur ratio N/COOH idéal. Le ratio idéal final N/(P+COOH) du système ternaire a été obtenu lorsque la composition des micelles en ON a atteint un maximum de 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles, soit 20 % (*mol/mol*) de la quantité molaire totale de (P+COOH) (Figure 2.8). Lors de l'addition de l'ON aux micelles de PEG₆₈-b-PAEMA₂₄/P(MAA₅₀-co-EA₄₀-co-BMA₁₀), une diminution de l'IP (de 0,11 à 0,07) et une augmentation de l'intensité de la lumière diffusée (de 79 kilocoups (kcps) à 179 kcps) ont été notées. Ainsi, l'addition d'ON aux micelles préformées permettrait de neutraliser l'excès de charges positives du copolymère cationique et favoriserait la condensation du coeur hydrophobe des micelles. Une tendance similaire a été observée pour les copolymères de PEG₆₈-b-PDMEAEMA₂₅ et de PEG₆₈-b-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁). Le ratio N/(P+COOH) idéal pour chacun des copolymères a été établi à 1,14 pour les PICMs ternaires de PEG₆₈-b-AEMA₂₄/P(MAA₅₀-

co-EA₄₀-*co*-BMA₁₀)/ON (61/29/10 % *p/p*), 1,10 pour le PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅/P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀)/ON (62/28/10 % *p/p*) et 1,24 pour le PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁)/P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀)/ON (64/26/10 % *p/p*). En somme, à un pH physiologique, des PICMs ternaires de petite taille (~ 30 nm) et présentant une distribution de taille unimodale (IP < 0,1) ont été obtenues (figure 2.8).

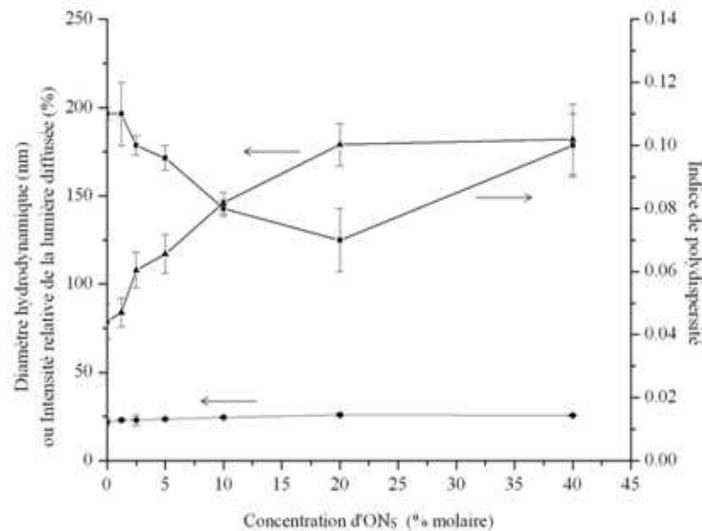


Figure 2.8. Effet d'une addition séquentielle d'ON sur le diamètre hydrodynamique moyen (♦), l'intensité de la lumière diffusée (▲) et l'IP (■) de micelles ternaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄. La concentration en ON est exprimée en pourcentage molaire d'ON par rapport à la quantité molaire totale de groupements ionisables anioniques (P+COOH). Moyenne ± ET (n=3).

L'ordre d'addition des composantes s'est avéré être un paramètre influant sur les propriétés colloïdales du système ternaire (tableau 2.3). En effet, la taille et l'IP optimaux ont été obtenus lorsque l'ON était additionné après la formation des complexes binaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄/P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀). En effet, l'addition du P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) à des micelles préformulées de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄/ON engendre une augmentation de l'IP (0,253) et du diamètre (47 nm). L'addition d'une importante quantité de charges négatives provenant du copolymère P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) pourrait

conduire à une légère déstabilisation des micelles de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ préformées et expliquerait l'augmentation de la taille et de l'IP. Afin d'établir un seul protocole expérimental pour la préparation des complexes ternaires pour la suite du projet, l'ON a dorénavant été ajouté aux micelles de copolymères cationiques/P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) préformées.

Tableau 2.3 Influence de l'ordre d'addition des composantes sur les propriétés colloïdales de micelles ternaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄.

Ordre d'addition	^a Diamètre (nm)	^a IP	^a Intensité de la lumière diffusée (Kcps)
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄ + ON + P(MAA ₅₀ - <i>co</i> -EA ₄₀ - <i>co</i> -BMA ₁₀)	47	0,379	253
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄ + P(MAA ₅₀ - <i>co</i> -EA ₄₀ - <i>co</i> -BMA ₁₀) + ON	24	0,058	148
P(MAA ₅₀ - <i>co</i> -EA ₄₀ - <i>co</i> -BMA ₁₀) + ON + PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄	25	0,076	170

^a Les micelles ternaires ont été préparées à un ratio N/(P+COOH) de 1,1. L'ON représente 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄/ P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) /ON, soit 20% de la quantité molaire totale de groupements ionisables anioniques (P+COOH).

3. CARACTÉRISATION DE L'INCORPORATION D'ACIDES

NUCLÉIQUES DANS LES MICELLES

L'effet du ratio N/(P+COOH) sur le taux d'incorporation de l'ON dans les PICMs ternaires a été mis en évidence par gel d'électrophorèse (figure 2.9). La disparition progressive de la bande de l'ON libre lors de l'augmentation du ratio N/(P+COOH) confirme la formation de PICMs ternaires. L'entière incorporation de l'acide nucléique dans les micelles a lieu à partir d'un ratio N/(P+COOH) proche de la stoechiométrie et semble être influencée par le degré d'ionisation de l'amine. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de Reschel *et al.* (2002) qui a évalué l'effet de la nature des groupements amines sur l'incorporation d'un ADN plasmidique. Selon cette étude, l'ADN plasmidique était complètement incorporé dans les complexes binaires de PAEMA,

poly(méthacrylate de 2-(triméthylamino)éthyle) (PTMAEMA) et PDMAEMA à des ratio N/P qui tendent vers la stoechiométrie. Plus particulièrement, des ratios N/P de 0,90, 0,93 et 0,96 ont été rapportés pour les micelles de PAEMA, PTMAEMA et PDMAEMA, respectivement. D'autre part, les micelles ternaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ incorporent entièrement l'ON dès un ratio N/(P+COOH) de 0,75, alors que l'incorporation entière de l'ON pour les micelles ternaires de PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ ou de PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁) est observée à partir d'un ratio de 1,0. Ceci est cohérent avec le degré d'ionisation supérieur des copolymères d'amines primaires ($\alpha = 0,33$) comparativement aux copolymères de PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ ($\alpha = 0,22$) et PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁) ($\alpha = 0,31$). Cette densité de charge plus grande permettrait une meilleure interaction et incorporation du polyanion au sein de la micelle, telle qu'anticipé à la section 1.2. Conséquemment, moins de copolymère est requis pour assurer la complexation totale de l'ON, ce qui se traduit par un ratio N/P plus faible. Cette observation est en accord avec les résultats de Rungsardthong *et al.* (2003) qui ont démontré l'influence du degré d'ionisation de l'homopolymère de PDMAEMA sur l'efficacité d'incorporation d'un ON. Cette étude démontre une corrélation directe entre l'augmentation du degré d'ionisation du polymère et l'efficacité d'incorporation de l'ON au sein de la micelle. Une incorporation entière de l'ON était également observée à des ratios stoechiométriques (Rungsardthong *et al.* 2003).

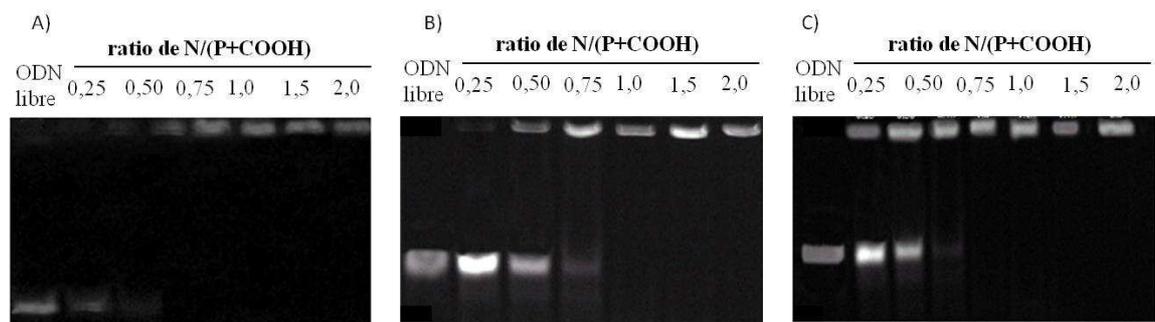


Figure 2.9. Gel d'acrylamide (4-20%) en condition dénaturante de PICMs ternaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ (A), PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ (B), et de PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁) (C), préparées à un ratio de N/(P+COOH) variant de 0,25 à 2,0.

Il est possible de convertir le ratio molaire $N/(P+COOH)$ en ratio de charge (+/-) en fonction du degré d'ionisation des copolymères. Ainsi, la neutralisation complète des charges (ratio +/- = 1) se produirait à un ratio théorique $N/(P+COOH)$ de 2,5 pour les complexes de $PEG_{68}-b-PAEMA_{24}$, à 3,8 pour le $PEG_{68}-b-PDMAEMA_{25}$ et à 2,7 pour le $PEG_{68}-b-P(AEMA_{13}-co-DMAEMA_{11})$. La divergence entre les valeurs du ratio $N/(P+COOH)$ théoriques et celles observées expérimentalement (figure 2,9) peut être expliquée par une protonation plus efficace des amines lors de leur complexation avec l'ON. En effet, l'ionisation de l'électrolyte faible est induite lors de la formation d'un complexe polyionique entre un électrolyte faible (ici l'amine) et fort (ici le groupement phosphate de l'ON). Cette ionisation est due à la proximité de groupements voisins qui facilite la neutralisation de paires de charge opposées. De même, la neutralisation des charges confère au complexe une stabilité accrue en réduisant les forces ioniques répulsives et en augmentant l'entropie du système suite au relâchement des contre-ions dans le micro-environnement (Kabanov *et al.* 2003, Wakebayashi *et al.* 2004). Par ailleurs, l'effet de proximité peut également affecter le degré d'ionisation des acides carboxyliques du $P(MAA_{50}-co-EA_{40}-co-BMA_{10})$. En effet, Feldstein *et al.* (2009) ont démontré que les fortes interactions électrostatiques entre un polycation de $P(DMAEMA-co-MMA-co-BMA)$ et un polyacide, tel que le $P(MAA-co-EA)$, induisent une modification du degré d'ionisation des groupements acide carboxylique.

Afin de confirmer les résultats observés sur gel, un essai de complexation a été effectué avec le bromure d'éthidium (BrEt), un agent qui émet une fluorescence lorsqu'il s'intercale entre les bases de l'ON (Oishi *et al.* 2006). Une diminution progressive de l'intensité de fluorescence du BrEt a été observée en fonction de l'augmentation des ratios molaires $N/(P+COOH)$, ce qui corrèle avec une neutralisation des charges de l'ON et la formation progressive des micelles (Wakebayashi *et al.* 2004). En effet, l'ON, une fois complexé au copolymère cationique et incorporé dans le cœur micellaire, n'est plus accessible au BrEt, ce qui se traduit par une diminution de la fluorescence. Le profil d'intensité de la fluorescence en fonction des ratios molaires N/P et $N/(P+COOH)$ pour des

PICMs binaires et ternaires a été établi pour chacun des copolymères cationiques (figure 2.10). L'intensité minimale a été observée à partir d'un ratio stoechiométrique ($N/P = 1$ et $N/(P+COOH) = 1$) pour les deux systèmes micellaires et tous les copolymères cationiques. Ces résultats confirment que tous les polymères incorporent l'ON à des ratios stoechiométriques, mais qu'aux ratios sous-optimaux, le polymère PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ intéragit plus efficacement avec l'ON.

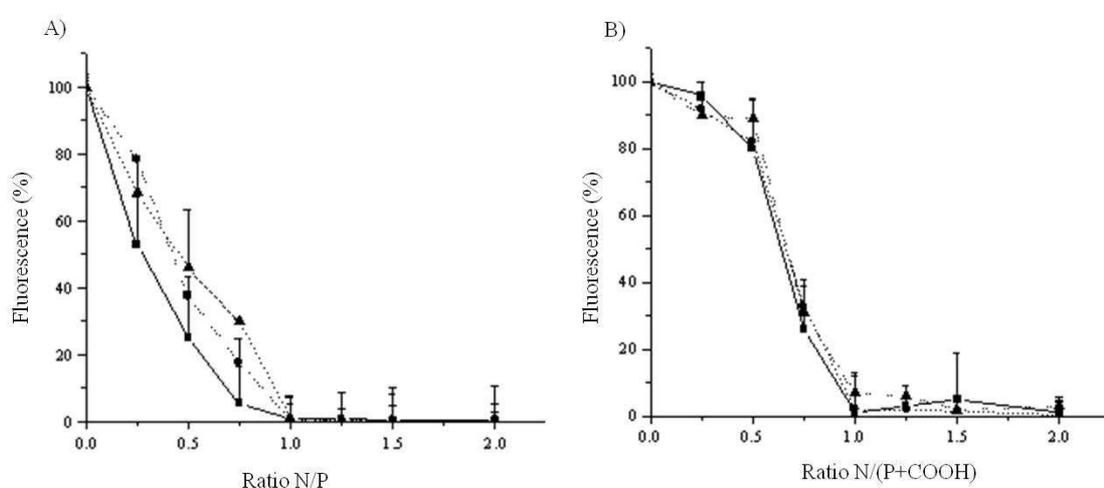


Figure 2.10. Fluorescence du BrEt lors de l'incorporation de l'ON dans les micelles binaires (A) et ternaires (B). Les micelles binaires et ternaires ont été préparées à partir des copolymères de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄(■), PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅(▲) et de PEG-₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) (●). La contribution de l'ON représente 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles ternaires de copolymères cationiques/ P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) /ODNs. Moyenne ± ET (n=3).

Afin d'être des vecteurs adéquats pour la thérapie génique, les micelles doivent maintenir leur intégrité et protéger leur contenu lorsqu'elles se retrouvent dans la circulation sanguine, mais doivent toutefois pouvoir se dissocier afin de libérer leur cargaison une fois le site d'action atteint. Ainsi, la stabilité des PICMs face à la dissociation a été étudiée en présence d'un polyanion présent dans la circulation sanguine, l'héparine.

Une concentration croissante d'héparine a été ajoutée à des PICMs binaires et ternaires préparées aux ratios N/P et N/(P+COOH) idéaux et l'accessibilité de l'ON a été évaluée par la fluorescence du BrEt, tel que décrit précédemment (figure 2.11). La déstabilisation des PICMs et l'expulsion de l'ON provoquées par l'héparine se traduit par une augmentation de la fluorescence du BrEt. Les résultats montrent qu'une plus grande intensité de fluorescence est obtenue pour les micelles de PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ (40 %), comparativement à celles de PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) (20 %) et de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ (7%). Cette tendance est observée pour les deux systèmes micellaires, soit les PICMs binaires et ternaires. Ceci suggère une déstabilisation plus facile des micelles composées d'amines tertiaires et renforce l'hypothèse de Rungsardthong *et al.* (2003) d'une interaction plus forte entre l'ON et les amines primaires. En effet, une densité de charge plus importante sur le polycation offrirait de plus fortes interactions électrostatiques avec le polyanion. De plus, on constate que la variation de l'intensité de la fluorescence en fonction de la nature du copolymère cationique est beaucoup moins marquée pour les micelles ternaires (figure 2.11.a) que les micelles binaires (figure 2.11.b). La présence du P(MAA₅₀-*co*-EA₄₀-*co*-BMA₁₀) contribuerait à augmenter les forces hydrophobes au cœur des micelles et ainsi participerait à la stabilisation des micelles. Il est toutefois possible de conclure, que pour les deux systèmes (binaire et ternaire), le PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ produit des micelles plus stables que les copolymères possédant des groupements d'amines tertiaires.

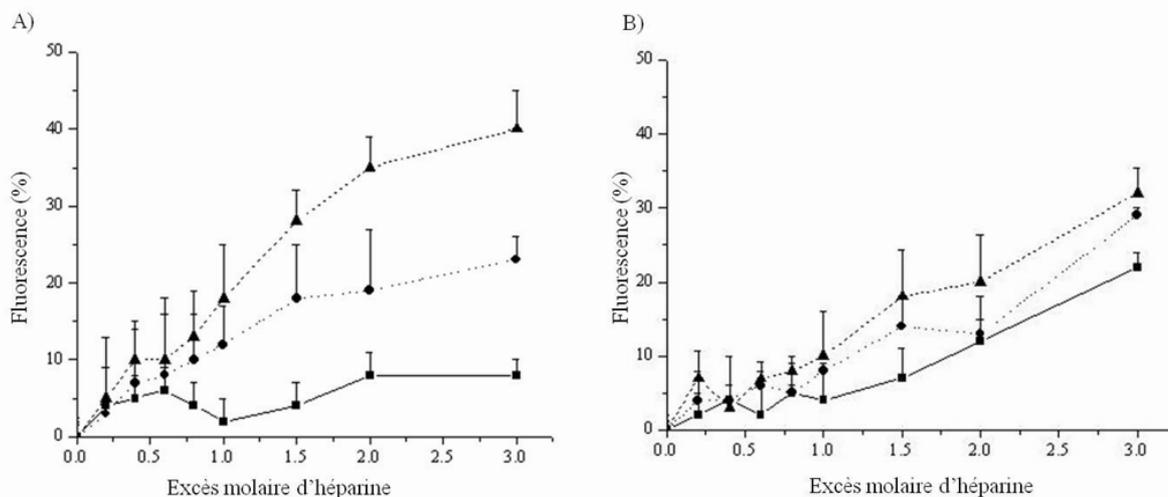


Figure 2.11. Fluorescence du BrEt générée suite à l'addition d'héparine à des micelles binaires (A) et ternaires (B). Les micelles binaires et ternaires ont été préparées à partir des copolymères de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ (■), PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ (▲) et de PEG₆₈-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) (●), avec une même concentration molaire d'ON. La contribution de l'ON représente 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles ternaires. L'intensité de fluorescence est corrigée par rapport à l'intensité du BrEt non complexé. Moyenne ± ET (n=3).

4. EFFET DE LA NATURE DE L'ACIDE NUCLÉIQUE SUR LA FORMATION DES MICELLES

Au cours des dernières années, plusieurs modifications chimiques ont été apportées aux acides nucléiques afin d'accroître leur stabilité et leur affinité pour leur cible ainsi que pour parfaire leur mécanisme d'action. Cependant, il est possible que ces variations structurales affectent les propriétés physicochimiques des PICMs. Nous avons donc étudié l'effet de la nature de l'acide nucléique sur les propriétés physicochimiques de micelles binaires et ternaires préparées à partir d'ONs de première et de troisième générations, de

même qu'un pARNi. Les séquences d'acides nucléiques étudiés sont présentées au tableau 2.4 (notez que l'ON-P et le FANA ont la même séquence).

Tableau 2.4. Caractérisation des acides nucléiques étudiés

Acides nucléiques	Caractéristique	Cible	Séquence
ON (ISIS 3521)	ON phosphorothioate 20 bases nucléotides	PKC- α	5'-GTTCTGGCTGGTGAGTTTCA-3'
FANA	2'-fluoro arabino 21 bases nucléotides	BCI-2	5'-fa(CAA)d(CGT)fa(TTC)d(GGA)fa(CCG)d(TAT)fa(TTC)-3'
ON-P	ON phosphothioate de séquence analogue au FANA 21 bases nucléotides	BCI-2	5'-d(CAACGTTTCGGACCGTATTTC)-3'
pARNi	Double brin d'ARN 32 bases nucléotides	Luciférase	5'-GCUUGAAGUCUUUAAUAAAtt-3' 3'-ggCGAACUUCAGAAAUUAAUU-5'

Les propriétés physicochimiques des PICMs binaires et ternaires préparées à partir de ces acides nucléiques sont comparées au tableau 2.5. On constate que la nature de l'acide nucléique influence de façon plus marquée les propriétés colloïdales des PICMs binaires que des PICMs ternaires. En effet, des PICMs ternaires de tailles variant entre 26 et 33 nm ($IP < 2,0$) et présentant une distribution de taille unimodale ont été obtenues indépendamment de la nature de l'acide nucléique (tableau 2.5). Une faible variation des propriétés physicochimiques des micelles suivant l'addition de l'acide nucléique était attendue puisque la proportion en acide nucléique des micelles ne correspond qu'à 10 % (p/p) et que le matériel génétique a été ajouté aux micelles binaires de copolymère cationique/ P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) préformulés.

Plusieurs paramètres affectent les propriétés colloïdales des micelles, tels que la flexibilité de la chaîne cationique, la structure chimique de l'acide nucléique, l'hydrophobicité et la densité de charge (Sundaram et al. 2007). Par exemple, Sundaram et

al. (2007) ont démontré que la nature de l'ON influence les propriétés physicochimiques des complexes de PEI. Bien que la densité de charge d'un ON-PS et d'un ON phosphodiester (ON-PO) soit similaire due aux groupements phosphates, leurs résultats démontrent que l'hydrophobie supérieure de l'ON-PS favorise davantage son interaction avec le PEI et influence également la taille des complexes (Sundaram *et al.* 2007). Dans le cas des PICMs binaires, des tailles plus importantes ont été obtenues avec le FANA comparativement aux ONs-PS (ON ISIS 3521 et l'ON-P) (tableau 2.5). La substitution de l'ON-PS par le FANA semble influencer d'avantage la taille des micelles d'AEMA que celles de DMAEMA. En effet, une augmentation de 27% de la taille des micelles ON 3521/PEG₆₈-b-PAEMA₂₄ (65 nm) comparativement aux micelles FANA/PEG₆₈-b-PAEMA₂₄ (90 nm) est observée (tableau 2.5). Toutefois, la variation des tailles est moindre pour les micelles de FANA/PEG₆₈-b-PDMAEMA₂₅ (~ 6%). L'influence des tailles des PICMs peut être attribuée à une plus grande hydrophobie du FANA comparativement à celle de l'ON-PS. De plus, la formation de ponts hydrogènes supplémentaires entre le groupement fluor du FANA et les groupements amines du copolymère cationique renforcent l'interaction entre l'ON et le polymère et rend les chaînes neutralisées plus hydrophobes. Ainsi, la combinaison de ces effets contribuent à diminuer le rayon de courbure à l'interface cœur/couronne (diminution de l'interface du domaine hydrophobe/hydrophile) et induit une augmentation de la taille des micelles.

Des tailles de près de 100 nm et des IP supérieurs à 2,0 ont été observées pour les PICMs binaires préparées avec un pARNi (tableau 2.5). De plus, les distributions de tailles étaient polymodales pour des complexes préparés avec un excès de charge négative ou positive. Kong *et al.* (2009) ont suggéré que l'efficacité de condensation du pARNi et les propriétés physicochimiques des PICMs qui en résultent sont influencées par la flexibilité moindre du pARNi, comparativement au simple brin d'ARN. Dans notre cas, la rigidité du pARNi pourrait nuire à sa complexation dans le cœur des micelles, entraînant une augmentation de la taille des PICMs.

Tableau 2.5. Effet de la nature du matériel génétique sur les propriétés colloïdales des PICMs binaires et ternaires.

Copolymère	Diamètre (nm) [IP]				
	Aucun acide nucléique ^c	ON 3521	FANA	ON-P	PARNi
MICELLES BINAIRES^a (sans le P(MAA ₅₀ -co-EA ₄₀ -co-BMA ₁₀))					
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄	*	65 [0,15]	90 [0,17]	59 [0,15]	94 [0,25]
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅	*	35 [0,13]	33 [0,13]	28 [0,12]	101 [0,31]
PEG ₆₈ - <i>b</i> -P(AEMA ₁₃ -co-DMAEMA ₁₁)	*	52 [0,14]	80 [0,16]	45 [0,14]	76 [0,28]
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PAEMA ₂₅	*	21[0,13]	56 [0,15]	28 [0,13]	
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PAEMA ₁₁	*	21 [0,17]	22 [0,16]	22 [0,17]	
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅	*	26 [0,10]	29 [0,12]	28 [0,12]	
PEG ₁₁₃ - <i>b</i> -PDMAEMA ₁₁	*	28 [0,20]	23 [0,16]	22 [0,14]	
MICELLES TERNAIRES^b (avec le P(MAA ₅₀ -co-EA ₄₀ -co-BMA ₁₀))					
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PAEMA ₂₄	23 [0,10]	26 [0,10]	27 [0,13]	26 [0,14]	28 [0,17]
PEG ₆₈ - <i>b</i> -PDMAEMA ₂₅	21 [0,20]	29 [0,14]	33 [0,13]	29 [0,15]	32 [0,20]
PEG ₆₈ - <i>b</i> -P(AEMA ₁₃ -co-DMAEMA ₁₁)	23 [0,12]	27 [0,12]	26 [0,16]	27 [0,15]	29 [0,21]

^a Les micelles binaires ont été préparées à un ratio molaire N/P de 1,5.

^b Les micelles ternaires de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ et de PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ ont été préparées à un ratio N/(P+COOH) de 1,1 alors que les micelles ternaires de PEG-*b*-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁) ont été préparées à un ratio N/(P+COOH) de 1,2. La contribution de l'ON représente 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles ternaires.

^c Les analyses ont été effectuées avant l'ajout de l'acide nucléique. Le ratio N/COOH était de 1,30 pour les micelles de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ et de 1,4 pour les micelles de PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ et de PEG-*b*-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁).

*Les copolymères sont présents sous forme d'unimères en solution et ne s'auto-assemble pas.

Afin d'évaluer l'influence de la couronne hydrophile sur la formation des micelles, des PICMs binaires ont été préparées à partir d'un copolymère cationique dont la chaîne hydrophile est constituée de 113 unités monomériques d'oxyde d'éthylène (5000 g/mol), soit le PEG₁₁₃-*b*-PAEMA₂₅ et le PEG₁₁₃-*b*-PDMAEMA₂₅. En diminuant le ratio monomère cationique/oxyde d'éthylène, il a été possible d'observer que les tailles des micelles binaires de FANA ainsi que l'IP diminuent. En effet, l'augmentation de l'encombrement stérique engendré par des chaînes de PEG plus volumineuses (plus longue) contraignent les micelles à adopter une conformation permettant de maximiser l'espaces entre ces chaînes ce qui donne lieu à des micelles de plus petite taille (Dufresne *et al.* 2008). Plusieurs études

ont rapportées une tendance similaire pour des complexes polyélectrolytes (Glodde *et al.* 2006, Adams *et al.* 2008, Dufresne *et al.* 2008, De Martimprey *et al.* 2009). En outre, lorsque le segment cationique passe de 11 à 25 unités de répétition (soit une augmentation du ratio monomère cationique/ oxyde d'éthylène), la taille des micelles binaires de FANA et d'AEMA ou de DMAEMA augmente de 22 nm à 56 nm et de 23 à 29 nm, respectivement. Pour sa part, l'IP passe de 0,15 à 0,16 et de 0,12 à 0,16 pour les mêmes micelles binaires d'AEMA et DMAEMA, respectivement. Une tendance similaire a été observée pour les micelles binaires d'ON de première génération (*i.e.* ON 3521 et ON-P). Finalement, il est possible de noter que les propriétés colloïdales des micelles binaires de PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ sont moins affectées par la nature de l'acide nucléique que les micelles de copolymères d'amine primaire.

D'autre part, l'effet de la nature du matériel génétique (pARNi) sur son incorporation dans les micelles binaires et ternaires a été étudié. Pour ce faire, le taux d'incorporation de pARNi dans les PICMs binaires et ternaires a été évalué par gel d'électrophorèse à des ratios molaires croissants de N/P et N/(P+COOH), respectivement (figure 2.12). L'augmentation des ratios molaires est caractérisée par une atténuation progressive de la bande du pARNi libre, ce qui est en accord avec la formation progressive des micelles. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour l'ON ISIS 3521 présenté à la figure 2.9. L'entière incorporation du pARNi se produit à des ratios molaires N/P et N/(P+COOH) de 1,5 et 1,25 respectivement. Ainsi, à un ratio supérieur à 1,50, tout le pARNi est complexé et incorporé dans les micelles. Ce ratio est significativement supérieur à celui obtenu pour les micelles de FANA et de PS-ON, indiquant que la nature du matériel génétique peut affecter son incorporation dans les micelles. Cette tendance a également été observée pour les trois copolymères cationiques en présence ou non du copolymère anionique de P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀). Il est à noter que le profil de migration du pARNi aux faibles ratios molaires présente une bande caractéristique du pARNi libre ainsi qu'une seconde bande de poids moléculaire plus élevé (migration plus lente). Cette dernière

pourrait résulter d'une neutralisation partielle des charges du pARNi par le copolymère cationique.

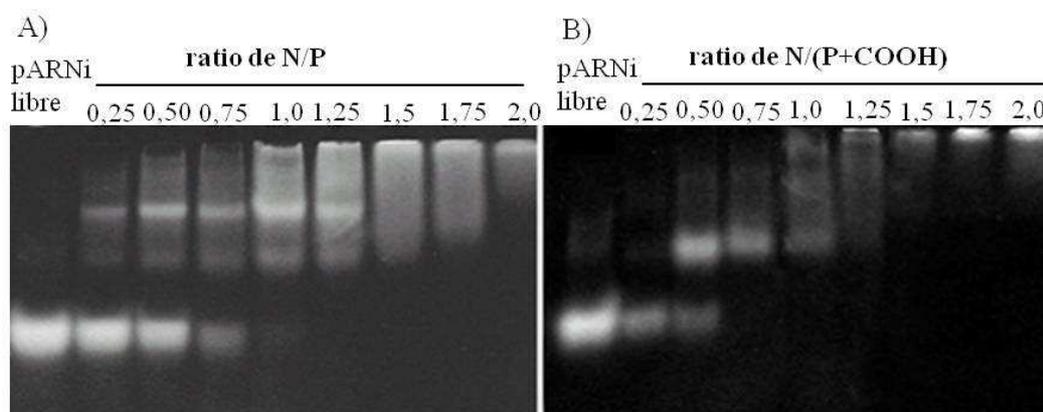


Figure 2.12. Gel d'acrylamide, en conditions dénaturantes (4-20%), de micelles binaires (A) et ternaires (B) préparées à partir du copolymère de PEG₆₈-*b*-AEMA₂₄ et du pARNi à des ratios N/P et N/(P+COOH) variant de 0,25 à 2,0.

En résumé, nous avons procédé à la caractérisation physicochimique de PICMs binaires et ternaires. Il a été possible de préparer des complexes ternaires stables de taille variant entre 21 et 33 nm ($IP < 0,2$) à partir de copolymères cationiques blocs et ce pour tous les acides nucléiques. L'addition d'un copolymère sensible au pH ne semble pas nuire à l'incorporation de l'ON et influence même avantageusement les propriétés colloïdales des PICMs.

5. PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES MICELLES

CIBLÉES

La neutralisation des charges du segment cationique par les polyanions (ON et copolymère d'acide méthacrylate) conduit à la formation spontanée d'une structure de type

cœur/couronne, avec les chaînes de PEG composant la couronne hydrophile. Cette dernière permet la formation d'une barrière stérique qui stabilise les complexes, diminue leur opsonisation et assure un temps de circulation prolongée *in vivo* (Deshpande *et al.* 2002). Toutefois, cette couronne hydrophile masque également les charges du vecteur, ce qui diminue leurs interactions avec les cellules cibles et leur capture subséquente (Torchilin 2007). La fixation d'une molécule de reconnaissance à la surface du vecteur permettrait de promouvoir leur capture cellulaire et de minimiser leur accumulation au niveau des cellules saines (Torchilin 2000). Les anticorps figurent parmi les ligands les plus efficaces en terme de spécificité et d'affinité, et possèdent un large répertoire de cibles potentielles (Torchilin 2004).

5.1. Stratégie de couplage

L'un des objectifs de ce projet de recherche était d'élaborer une méthodologie de couplage afin de décorer les micelles d'un fragment d'anticorps anti-CD71 (Fab') dirigé contre les récepteurs de la transferrine et de valider *in vitro* le potentiel d'internalisation de ces vecteurs. L'utilisation d'un agent de couplage hétérofonctionnel afin de lier l'anticorps et le copolymère est la stratégie la plus couramment employée dans la préparation de micelles ciblées. Les bras espaceurs les plus utilisés sont le sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) (Garnett 2001), le 3-(2-pyridyldithio)propionate de *N*-succinimidyle (SPDP) (Merdan *et al.* 2003) et le 4-(*p*-maléimidophényl)butyrate de *N*-succinimidyle (SMPB) (Figure 2.13 a). Un exemple de la conjugaison d'un anticorps à un copolymère *via* un bras espaceur est présenté à la figure 2.13 b. La majorité des agents de couplage nécessite la présence d'une fonction amine, soit sur la molécule de reconnaissance ou sur le copolymère, afin de se conjuguer. Compte tenu qu'aucune différence significative de réactivité entre les lysines présentes sur un anticorps n'a été à ce jour démontrée, les amines impliquées dans la reconnaissance de l'anticorps par l'antigène sont susceptibles d'être conjuguées au bras espaceur. Ce type de conjugaison est donc à éviter puisque cela résulterait en une perte

d'affinité de l'anticorps envers son récepteur. D'autre part, la composition des copolymères cationiques utilisés dans ce projet (*i.e.* présence d'amine primaire sur le segment formant le cœur de la micelle) nous a contraints à trouver une solution alternative de couplage.

Une autre possibilité est la conjugaison directe du ligand au vecteur *via* un pont disulfure avec l'une des cystéines de l'anticorps. En effet, les fonctions thiols offrent une grande flexibilité chimique puisqu'elles peuvent réagir sélectivement et efficacement avec une fonction maléimide ou un autre thiol. Humphreys *et al.* (2007) ont utilisé les ponts disulfures afin de conjuguer plusieurs macromolécules à un seul anticorps et ont démontré que l'utilisation des groupements cystéines de l'anticorps n'affectent ni sa stabilité, ni son immunoréactivité. La conjugaison d'une macromolécule *via* un pont disulfure permet également d'obtenir un lien pouvant être clivé en milieu intracellulaire ce qui permettrait aux micelles de se détacher de l'anticorps avant que le récepteur ne soit recyclé vers la surface de la cellule (Wang *et al.* 1998, Garnett 2001). De plus, l'échange de pont disulfure est le mécanisme favorisé par la cystéine ionisée (cystéine sous forme de thiolate) lors de la formation de nouveau pont disulfure intermoléculaire (Bulaj *et al.* 1998). Par conséquent, nous avons préconisé le couplage *via* un échange de pont disulfure pour conjuguer un fragment d'anticorps (fab') à un copolymère cationique HS-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉. Le conjugué obtenu est le Fab'-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉.

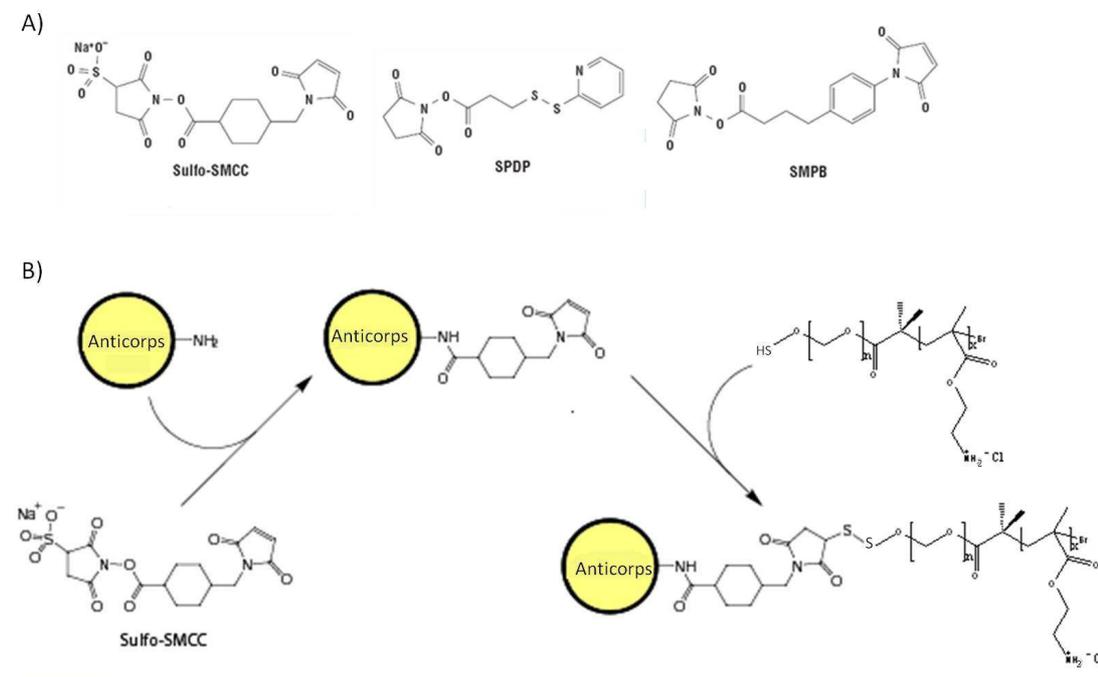


Figure 2.13. Structure des principaux agents de couplage employés lors de la conjugaison d'une molécule de reconnaissance (A) et représentation schématique de la conjugaison d'une molécule de reconnaissance à un copolymère cationique *via* un bras espaceur (B). Schéma adapté de Pierce biotechnology (<http://www.piercenet.com>).

5.1.1. Synthèse du copolymère cationique fonctionnalisé

Afin de demeurer accessible aux récepteurs cellulaires, le ligand doit, idéalement, être positionné en périphérie des micelles. Par conséquent, un segment de PEG plus long que celui constituant les copolymères cationiques non fonctionnalisés devrait être utilisé pour la conjugaison de l'anticorps. Ceci permet de minimiser l'encombrement stérique lors de la formation des micelles et favoriser l'accessibilité de l'anticorps aux récepteurs cellulaires. Pour ce faire, une chaîne de PEG hétérofonctionnalisée par des groupements thiol et hydroxyle (HS-PEG-OH) de 3500 g/mol (comparativement à une chaîne de PEG de 3000 g/mol pour les copolymères cationiques non fonctionnalisés) a été synthétisée par

polymérisation anionique par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène (OE) à partir du *tert*-butyle mercaptan (Dufresne *et al.* 2005) (figure 2.14).

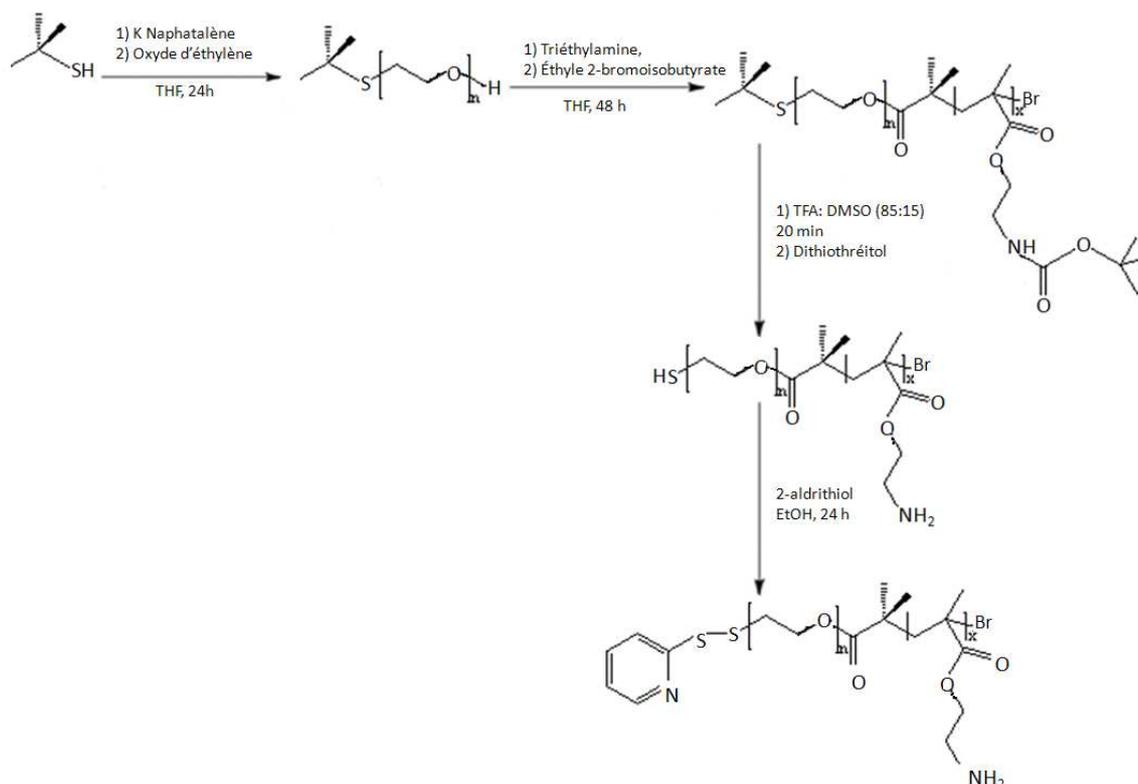


Figure 2.14. Voie de synthèse du pyridyl-SS-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉.

La polymérisation de l'OE est amorcée par l'activation du *tert*-butyle mercaptan par le naphthalène de potassium. La réaction est entièrement conduite sous atmosphère inerte et anhydre afin d'éviter l'activation de la polymérisation de l'OE par des molécules d'eau, ce qui conduirait à la synthèse de PEG homofonctionalisé par un groupement hydroxyle (OH-PEG-OH). Notons que la fonction *tert*-butyl (tBu) sert ici de groupement protecteur pour le thiol afin d'éviter la formation de ponts disulfure intermoléculaires au cours de la réaction ou d'amorcer la polymérisation de part et d'autre du thiol. De plus, le groupement tBu permet d'obtenir un thiolate stable capable d'amorcer efficacement la polymérisation. Le

tableau 2.6 présente une série de polymères de type tBu-S-PEH-OH synthétisés et caractérisés par ^1H RMN et CES. Pour l'ensemble des PEG synthétisés, un IP inférieur à 1,2 et un degré de fonctionnalisation par le groupement thiol entre 69 et 92% ont été obtenus. Le degré de fonctionnalisation du copolymère par le groupement thiol a été estimé par ^1H RMN en comparant le ratio du signal du groupement *tert*-butyle (1,32 ppm (9 H)) ou celui du groupement méthylène adjacent au thioéther (2,75 ppm (2H)) au signal du groupement hydroxyle. Le groupement hydroxyle a préalablement été réagit avec de l'anhydride trifluoroacétique afin de générer un groupement facilement quantifiable, le trifluoacétate (4,50 ppm (2H)).

Tableau 2.6. Caractérisation des polymères de PEG fonctionnalisés par un groupement thiol.

Polymères	^1H RMN	% de fonctionnalisation		CES		
	Mn	tBu-S-CH ₂	tBu	Mn	Mw	IP
tB-S-PEG-OH	6900	95	92	6100	5400	1,12
tB-S-PEG-OH	3500	85	83	3600	3900	1,08
tB-S-PEG-OH	3157	82	79	3100	3400	1,06
tB-S-PEG-OH	2754	75	73	2500	2300	1,11
tB-S-PEG-OH	2507	67	69	2400	2600	1,08

Le tBu-S-PEG-OH est ensuite converti en macroinitiateur à la PRTA puis copolymérisé avec les monomères d'AEMABoc, tel que décrit à la section 2.1. Finalement, l'hydrolyse en milieu acide permet de déprotéger les amines primaires et de réduire simultanément la fonction thiol ce qui permet d'obtenir le copolymère de HS-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ sous la forme d'un disulfure (*i.e.* PAEMA₁₉-PEG₆₈-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉). La voie de synthèse du HS-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ est présentée à la figure 2.14. La composition du HS-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ (Mn : 6900; IP :1,13; 80% de fonctionnalisation) a également été obtenue par ^1H RMN et confirmée par analyse élémentaire (tableau 2.7).

Tableau 2.7. Caractérisation du copolymère cationique fonctionnalisé

Copolymères	CES ^a			¹ H RMN		Analyse élémentaire	
	M _n	M _p	IP	M _n ^b	Densité d'amines ^b (mol/g) x 10 ³	Azote (% (p/p))	Densité d'amines ^b (mol/g) x 10 ³
HS-PEG₈₀-<i>b</i>-PAEMA₁₉	6900	7800	1,13	8000	2,76	4,04	2,89

^a La caractérisation par CES des copolymères d'AEMA a été effectuée sur la forme protégée des copolymères, soit ceux contenant l'AEMABoc.

^b La densité d'amine déterminée par ¹H RMN représente le rapport de moles d'unités monomériques sur l'inverse de la M_n. La densité d'amine déterminée par analyse élémentaire est obtenue en divisant la composition massique en azote (p/p%) par la masse molaire (MM) de l'azote (MM= 14 g/mol). Les calculs sont basés sur l'hypothèse que les polymères isolés sont complètement ionisés (MM_{AEMA⁺TFA⁻} = 244,2 g/mol).

Par la suite, un groupement pyridyle a été introduit en bout de chaîne du copolymère HS-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ afin de créer un pont disulfure labile et de minimiser la formation des ponts disulfures intermoléculaires entre les chaînes de copolymères cationiques. La facilité de déplacement du groupement pyridyle en fait un groupement partant couramment utilisé lors de réactions de couplage (Carlsson *et al.* 1978, Van Dijk-Wolthuis *et al.* 1999, Garnett 2001, Cyrille Boyer 2008). Par exemple, Van Dijk-Wolthuis *et al.* (1999) ont développé une méthode de couplage d'un copolymère de P(DMAEMA-*co*-AEMA) à une macromolécule *via* la fonctionnalisation des amines primaires du copolymère par un groupement SPDP, ce dernier permet l'introduction d'un groupement pyridyldisulfide labile sur le copolymère. La conjugaison de peptides, de protéine (tel que la transferrine) et d'un fragment Fab' en bout de chaîne du copolymère par la formation d'une liaison thioéther ou d'un pont disulfure a pu être effectuée suivant cette approche.

Dans le cadre de ce projet, le conjugué pyridyl-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ a été obtenu à la suite de la réaction du 2-aldrithiol avec le copolymère cationique, fraîchement réduit par le dithiothréitol (DTT) et purifié sur une colonne d'exclusion stérique de type Sephadex PD-10 sous argon, dans un mélange éthanol/eau. Les conditions optimales de purification ont été obtenues en effectuant la précipitation du polymère dans l'éther froid suivi d'une

purification par chromatographie d'exclusion stérique afin d'éliminer toute trace d'aldrithiol. Le taux de fonctionnalisation du copolymère par le pyridyldisulfide a été estimé par ^1H RMN en comparant l'intensité des signaux du groupement pyridyle (8,27 ppm (1 H), 7,79-7,75 ppm (2 H) et 7,18 ppm (1 H)) à celui du PEG (3,66 ppm (327 H)) (figure 2.15). De plus, le taux de fonctionnalisation a été confirmé par la réduction du pyridyl-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ par le DTT et en mesurant l'absorbance du sel de thiopyridone formé (343 nm). Le taux de fonctionnalisation du copolymère par le pyridyldisulfide a été estimé à 95%.

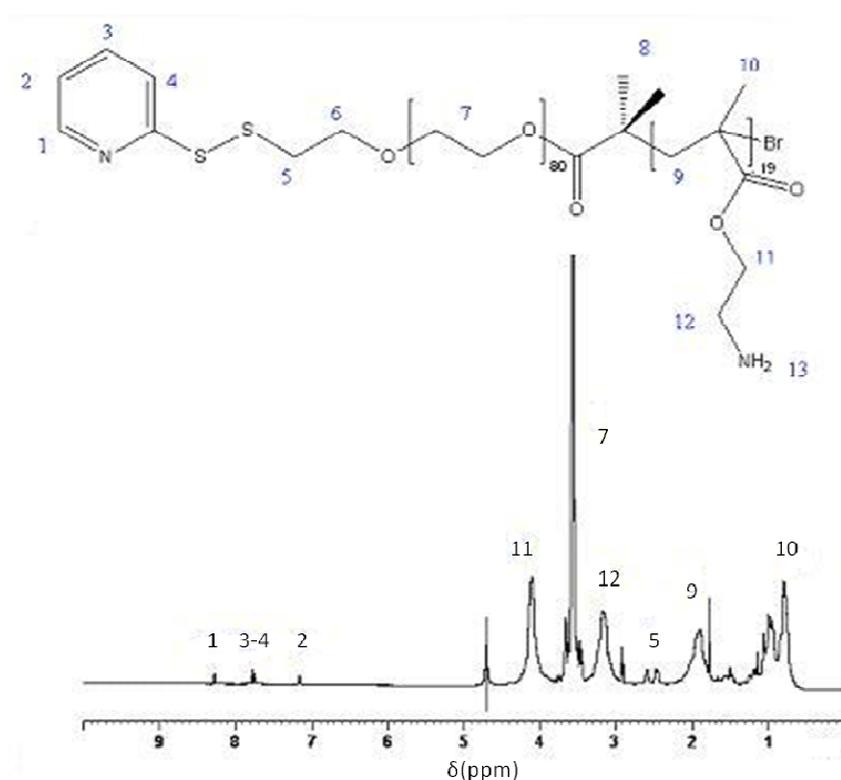


Figure 2.15. Spectre ^1H RMN du pyridyl-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉.

5.1.2. Préparation de l'anticorps Fab'

Pour sa part, le fragment Fab' a été obtenu à la suite de la digestion enzymatique de la région Fc de l'anticorps complet IgG1 par la ficine, suivi du clivage spécifique des ponts

disulfure entre les deux chaînes lourdes de l'anticorps par l'hydrochlorure de mercaptoéthylamine (MEA-HCl) (figure 2.16). Le MEA permet de cliver sélectivement les ponts disulfure situés entre les deux chaînes lourdes de l'anticorps tout en préservant ceux entre la chaîne légère et la chaîne lourde de l'anticorps (Dufresne *et al.* 1999). La réduction du fragment Fab₂ en Fab' par le MEA permet ainsi d'exposer le groupement thiol de la cystéine et le rendre disponible pour la formation d'un nouveau pont disulfure avec le copolymère thiolé.

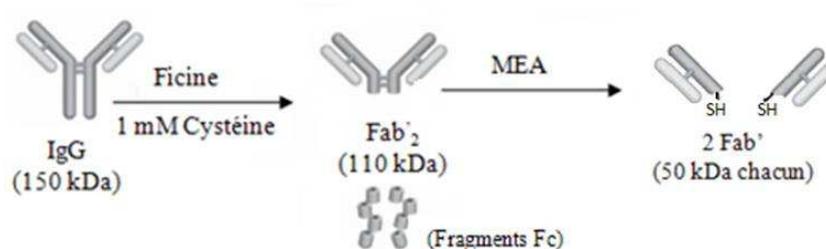


Figure 2.16. Principales étapes dans la préparation du fragment Fab' de l'anticorps. Schéma adapté de Pierce biotechnology (<http://www.piercenet.com>).

La masse moléculaire du fragment Fab' et la pureté du produit ont été évaluées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LCMS-TOF) (figure 2.17 a-b) et par gel électrophorèse (figure 2.17 c). L'analyse du spectre de déconvolution a permis de confirmer une masse moléculaire de 48 kDa pour le Fab' (fraîchement réduit), de 96 kDa pour le Fab₂ ainsi que de 150 kDa pour l'anticorps complet. Ces masses moléculaires sont en accord avec les valeurs théoriques rapportées dans la littérature, soit d'environ 50 kDa et 98 kDa pour les fragments Fab₂ et Fab', respectivement et 150 kDa pour l'anticorps complet, respectivement (Lu *et al.* 1999). Puisqu'une forme thiolate ne peut être maintenue très longtemps aux conditions ambiantes, la caractérisation du fragment Fab' par gel acrylamide et par LCMS-TOF ont été conduites à partir d'un échantillon fraîchement réduit et avant sa purification (*i.e* contenant toujours le sel de MEA). Compte tenu du très faible poids moléculaire du MEA (113,61 g/mol) ce dernier n'interfère pas dans les analyses par gel acrylamide et LCMS-TOF.

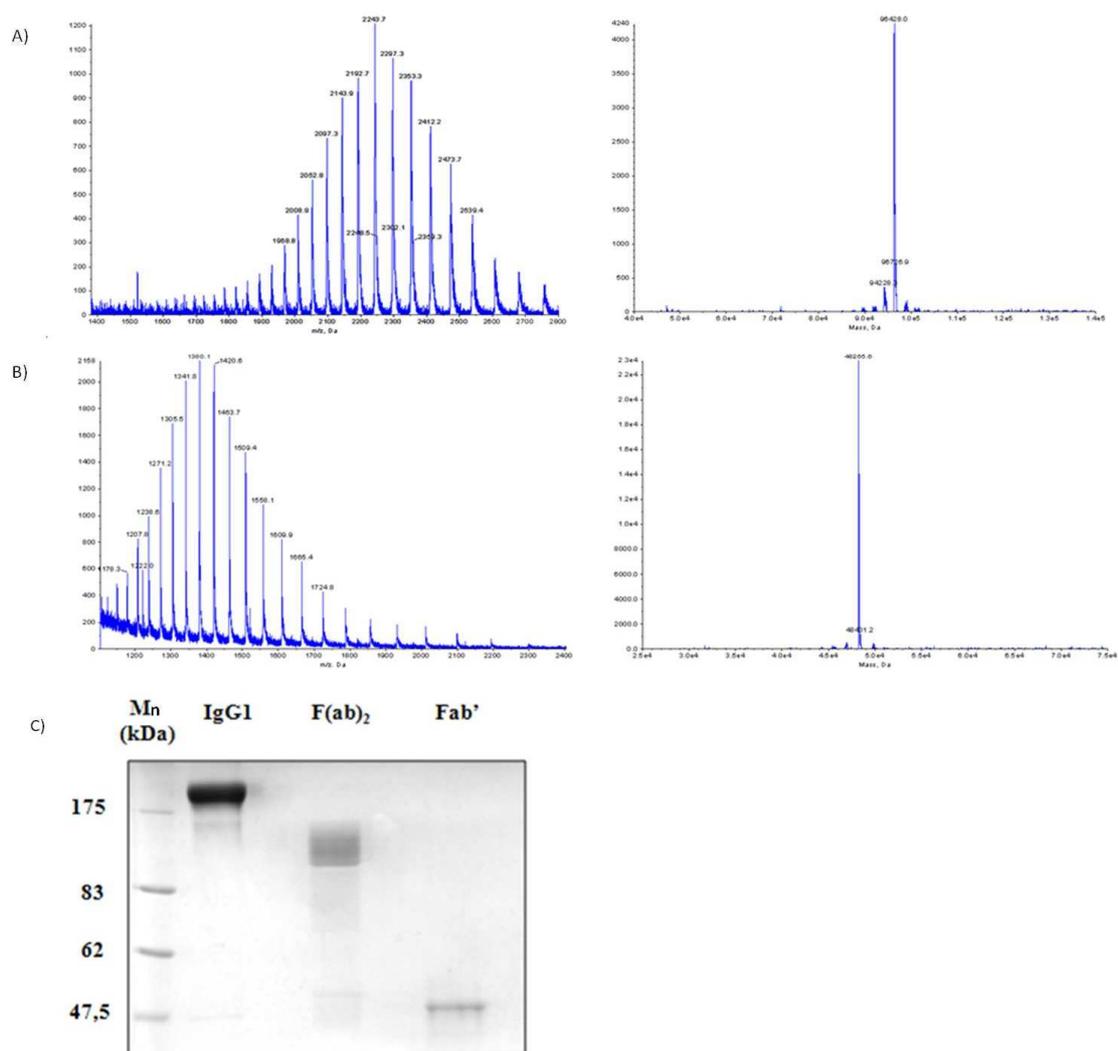


Figure 2.17. Spectres de spectrométrie de masse et déconvolution des spectres pour les fragments d'anticorps F(ab)₂ (A) et Fab' (B) et gel d'acrylamide non dénaturant (10%) de l'anticorps IgG1, du fragment F(ab)₂ et du fragment Fab' (C). Les spectres originaux sont présentés en annexe 1 et 2.

5.1.3. Couplage de l'anticorps (Fab') au copolymère cationique

Le conjugué final, le Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉, a été obtenu en ajoutant le pyridyl-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ à une solution contenant un excès de Fab', afin d'assurer une fonctionnalisation maximale du copolymère par le fragment Fab'. Ainsi, le thiolate du fragment Fab' déplacera le groupement labile du pyridyldisulfide selon un mécanisme d'échange de pont disulfure pour former un nouveau pont disulfure entre le fragment Fab' et le copolymère (figure 2.18 a). Le groupement pyridyle présente une absorbance maximale à 284 nm et son déplacement par le fragment Fab' engendre la formation du sel de thiopyridone dont l'absorbance caractéristique maximale est obtenue à 343 nm (Merdan *et al.* 2003). La formation de ce sel a été utilisé à titre d'indicateur afin suivre la progression de la réaction de couplage et de confirmer le couplage du Fab' au copolymère cationique (figure 2.18 b).

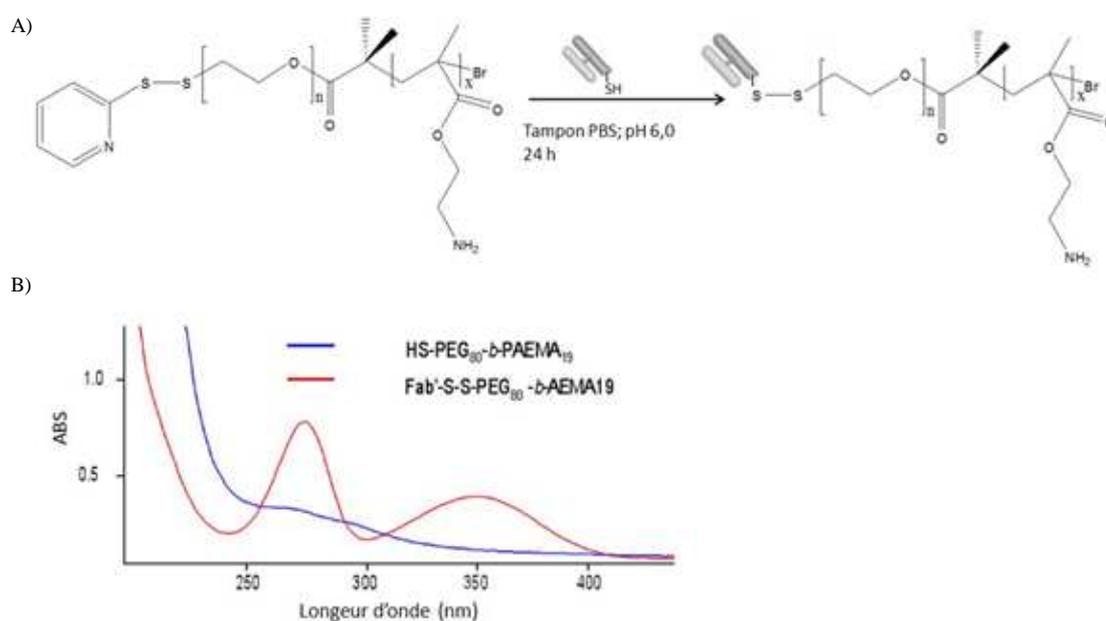


Figure 2.18. Voie de couplage de l'anticorps (Fab') au copolymère cationique de pyridyle-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ (A) et spectre UV-visible du HS-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ et du Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ (B).

Compte tenu de la faible différence de poids moléculaire entre le copolymère conjugué (55 000 g/mol) et les fragments Fab' libres (48 000 g/mol), une séparation efficace de ces derniers ne peut être obtenue par chromatographie d'exclusion stérique. Toutefois, la différence de degré d'ionisation du copolymère et de la protéine permet leur séparation sur une résine échangeuse de cations. Cette dernière permet de retenir électrostatiquement le copolymère cationique et d'éluer l'anticorps libre. En étudiant le profil d'élution du copolymère cationique et du Fab₂ sur la résine échangeuse d'ions, nous avons pu déterminer les conditions de purification optimales, soit à un pH de 6,0. Il est important de noter que puisque les fragments Fab' sont instables dans les conditions ambiantes, *i.e.* que le Fab₂ est rapidement reformé par la formation de ponts disulfures intermoléculaires entre deux fragments Fab', le profil d'élution de l'anticorps sur la résine a donc été établi à partir des fragments Fab₂. Selon ce profil, le Fab₂ élue dans les premières fractions de lavage dans un tampon à faible isotonicité (0,15 M), tandis que le copolymère cationique, retenu sur la résine anionique, élue à la suite d'une augmentation de l'isotonicité du tampon (à 3M).

Le rendement en masse de Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ purifié a été de 10 % et le taux de fonctionnalisation du copolymère par le fragment Fab' a été de 7 %. Ce dernier a été estimé par spectroscopie UV (280 nm) et confirmé par dosage de protéine à l'acide bicinchronique (BCA). Il est probable qu'une importante proportion de Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ ait élué dans les premières fractions avec l'anticorps libre, ce qui a pour effet de sous-estimer le rendement de la réaction de couplage. En effet, la présence d'interactions électrostatiques entre le copolymère cationique et l'anticorps pourrait entraîner une modification de l'affinité du copolymère cationique pour la colonne échangeuse d'ions, altérer son profil d'élution et par conséquent entraîner des chaînes de Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ lors de l'élution des fragments Fab' libres. D'autre part, puisque la forme thiolate du fragment Fab' ne peut être maintenu très longtemps aux conditions ambiantes, une proportion de Fab₂ pourrait s'être reformé ce qui rendrait le thiol de l'anticorps non disponible et inerte pour la formation d'un nouveau pont dissulfure avec le copolymère cationique. De plus, il est connu que la réactivité des thiolates et la vitesse de formation du

pont disulfure sont fortement influencées par l'environnement électrostatique. En effet, la présence d'une importante densité de charge à proximité du soufre ou l'effet d'induction peut altérer la distribution des électrons autour de l'atome de soufre et fortement modifier la réactivité du thiolate (Bulaj *et al.* 1998). De plus, le groupement thiol est généralement retrouvé sous une forme non ionisée à un pH physiologique (pKa entre 8 et 9) ce qui réduit également la réactivité du thiol et la vitesse de la réaction d'échange de pont disulfure (Bulaj *et al.* 1998).

Le Fab'-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ a été caractérisé par gel d'acrylamide et par LCMS-TOF. La migration sur gel d'acrylamide a permis d'observer une bande à un poids moléculaire, légèrement supérieur (> 47,5 kDa) à celui observé pour le fragment Fab' seul (figures 2.17 et 2.19). Étant donné que la forme Fab' ne peut être maintenue très longtemps aux conditions ambiantes, l'apparition de cette bande indique que le fragment Fab' est probablement conjugué au copolymère cationique. Toutefois, compte tenu de la faible masse du copolymère (7 kDa) comparativement à celle du fragment Fab' (48 kDa), il était attendu que la différence entre la masse du Fab' conjugué au copolymère (~ 55 kDa) et du fragment Fab' seul soit peu prononcée dans le gel d'acrylamide. Par ailleurs, une trainée d'une intensité plus importante est également observée à un poids moléculaire inférieur à 32,5 kDa. Cette trainée peut correspondre à des chaînes de copolymères cationiques libres. Par ailleurs, l'analyse du Fab'-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ par LCMS-TOF révèle une modification du chromatogramme comparativement à celui du fragment Fab'. Par contre, la conjugaison du copolymère à la protéine rend le conjugué multiplement chargé et trop hétérogène pour obtenir la déconvolution du spectre (annexe 3). Ces résultats préliminaires démontrent qu'une modification a été apportée au Fab', mais que les conditions de couplage et celles du protocole expérimental de purification doivent encore être optimisées afin d'améliorer le rendement de la réaction.

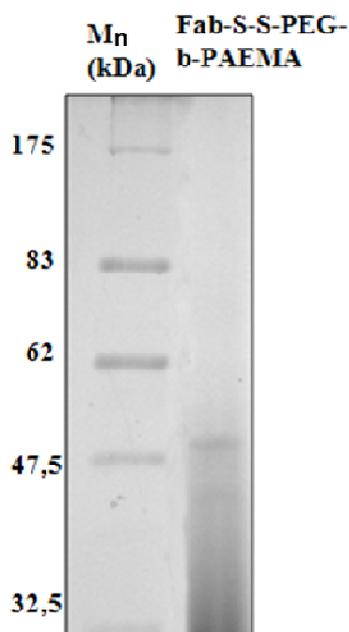


Figure 2.19. Gel d'acrylamide (10 %) du Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ dans des conditions non dénaturantes.

5.1.4 Optimisation des conditions de couplage

Plusieurs conditions de couplage et de purification ont été envisagées afin d'augmenter l'efficacité et le rendement de la réaction de couplage, dont les principales sont présentées au tableau 2.8. Puisque le mécanisme d'échange de pont disulfure est sensible au pH, la réaction de couplage a été effectuée à divers pH (4,5, 6,0 et 7,4). Ces valeurs de pH ont été choisies sachant que l'échange de ponts disulfure *via* un groupement pyridyl est optimal à un pH de 4,5 (Pierce biotechnology, <http://www.piercenet.com>) mais que ce groupement devient rapidement instable en solution à un pH supérieur à 8,0 (Wang *et al.* 1998).

Tableau 2.8. Résumé des principales conditions de couplages du Fab' en bout de chaîne du copolymère cationique.

<u>Conditions de la réaction de couplage</u>			<u>Rendement</u>	
pH	Durée, (Fab : Copolymère)	Abs_{343 nm} Sel de thiopyridone	Taux de Fonctionnalisation^a (%)	Efficacité de couplage^b (%)
pH 4,5	24 h, (1 :4)	0,1754	4,75	19,0
	24 h, (1:2)	0,1344	3,6	7,2
pH 7,4	24 h, (1:1)	0,1254	5,25	5,3
pH 6,0	24 h, (2:1)	0,2101	7,0	3,5
	24 h, (3:1)		8,50	2,8
	24 h, (1:1,5)	0,1610	2,0	3,0
	24 h, (1:3) (4 °C)		2,1	6,3
	10 h, (1:4)		3,0	12,0
	48 h, (2:1)	0,1177	6,25	3,2

^aLe taux de fonctionnalisation obtenue expérimentalement a été estimé par BCA

^bL'efficacité de couplage représente le rapport entre le taux de fonctionnalisation expérimental et le taux de fonctionnalisation maximal théorique.

La réaction de couplage a par la suite été menée sous différentes proportions molaires de fragment Fab'/copolymère cationique (3:1, 2:1, 1:1, 1:1,5, 1:3, 1:4) afin d'augmenter le taux de fonctionnalisation du copolymère cationique. Ces nouvelles conditions de couplage n'ont pas permis d'augmenter significativement le taux de fonctionnalisation du copolymère et l'efficacité de couplage de la réaction. Cependant, ces essais ont permis de conclure que la conjugaison du fragment Fab' en bout de chaîne du copolymère cationique est favorisée lorsque l'anticorps est ajouté en excès.

Par ailleurs, le mécanisme d'échange de pont disulfure étant de l'ordre de quelques heures, le temps de la réaction de couplage a été varié, de 10 h à 24 h et 48 h. En utilisant la formation du sel de thiopyridone par absorbance UV-vis comme indicateur de la progression de la réaction, le maximum d'absorbance à 343 nm est obtenu après 24 h de réaction. Ces diverses conditions de couplage ont mené à la formation du sel de thiopyridone, et donc les faibles rendements de copolymères récupérés seraient

principalement dus à un problème de purification. En effet, une modification du profil d'ionisation du copolymère une fois conjugué au fragment d'anticorps pourrait conduire à une plus faible rétention du copolymère.

Afin d'augmenter le taux d'ionisation du copolymère cationique de Fab'-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ et d'améliorer la rétention du copolymère sur la résine échangeuse d'ions, le milieu réactionnel a été acidifié à un pH de 4,5 avant son application sur la résine échangeuse d'ions. Cette procédure a permis d'augmenter le rendement de copolymère récupéré à 20 % et supporte l'hypothèse qu'une importante proportion de copolymère cationique aurait élué avec les fragments d'anticorps libres dans les conditions de purification initiale. D'autres expériences seraient nécessaires afin d'optimiser les conditions de couplage et d'augmenter le taux de fonctionnalisation du copolymère cationique par le fragment Fab'. Par exemple, la dialyse du milieu réactionnel pourrait être une alternative pour séparer le copolymère non fonctionnalisé du Fab-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉. Toutefois, la dialyse ne permet pas de séparer les fragments Fab' libres du copolymère ciblé et nécessite donc que le copolymère cationique soit présent en excès dans le milieu réactionnel ou être réalisée en séquence, après la résine échangeuses d'ions.

6. CAPTURE CELLULAIRE DES PICMS CIBLÉES

Des micelles binaires et ternaires de PEG₆₅-*b*-PAEMA₂₄ contenant 2 mol % de Fab'-S-S-PEG₈₀-*b*-PAEMA₁₉ ont été préparées au ratio idéal préalablement déterminé et caractérisées par DLD. Le copolymère d'AEMA a été sélectionné pour la formulation des PICMs ciblées puisque les études précédentes ont démontré que 1) l'incorporation de l'acide nucléique 2) les propriétés colloïdales et 3) la stabilité face à la dissociation en présence d'un polyanion (l'héparine) était les plus optimaux avec ce copolymère. De plus, l'incorporation entière du matériel génétique dans les PICMs ternaires de PEG₆₅-*b*-PAEMA₂₄ se produit à un ratio N/(P+COOH) inférieur à celui des copolymères DMAEMA

ce qui, permet de réduire la quantité de copolymère cationique nécessaire afin de condenser efficacement l'ON et les risques de cytotoxicité généralement associés aux copolymères synthétiques cationiques. Contrairement aux micelles inertes, les micelles ciblées présentent une distribution de taille polymodale avec des populations à 183 nm (85 %) et 42 nm (15 %) pour les Fab'-PICM binaires et à 300 nm (78 %) et 29 nm (20 %) pour les Fab'-PICM ternaires. Comparativement, les PICMs binaires et ternaires non ciblées équivalentes avaient des tailles de 50 nm (IP = 0,14) et de 30 nm (IP = 0,13), respectivement (tableau 2.9). Il est intéressant de noter que deux populations distinctes ont été formées en présence du Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉, soit des micelles décorées d'un fragment Fab'(180 nm ou 300 nm) et des micelles non ciblées dont les tailles sont similaires à celles observées au tableau 2.5 (50 ou 30 nm). En comparaison, Jeong *et al.* (2005) ont préparé des complexes de PEG-PEI/ADN plasmidique et de Fab'-PEG-PEI/ADN plasmidique et ont constaté que la taille des complexes de Fab'-PEG-PEI/ADN plasmidique était largement supérieure à celle des PEG-PEI/ADN, soit ~ 300 contre 200 nm, respectivement. Ces auteurs ont également démontré qu'une diminution significative de la taille des complexes ciblés (de 300 nm à 150 nm) était observée lorsque le ratio N/P était augmenté à 4.

Tableau 2.9. Propriétés colloïdales des formulations

	Non ciblées		ciblées		
	Diamètre (nm) [IP]	Population (%)	Diamètre (nm)	IP	Population (%)
PICMs binaires	50 [0,14]	100	183 42	0,38	85 15
PICMs ternaires	30 [0,13]	100	300 29	0,47	78 20

*Les PICMs ont été préparé à partir du PEG₆₈-b-PAEMA₂₄

Un premier essai de capture cellulaire a été réalisé sur des cellules cancéreuses de la prostate (PC-3) surexprimant des récepteurs à la transferrine. L'internalisation des PICMs de Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉/PEG₆₈-b-PAEMA₂₄/ON fluorescent (Fab'-PICM-ON-F),

par les cellules PC-3 a été quantifiée par cytométrie de flux. Les résultats préliminaires suggèrent que les micelles ciblées, soit celles décorées d'un fragment Fab', présentent un meilleur taux de capture cellulaire que les micelles contrôles non ciblées (PICM-ON-F) (figure 2.20). Par contre, il est difficile de conclure si l'augmentation de la capture des micelles est liée à la présence d'une molécule de reconnaissance ou aux tailles bimodales du système. À cette fin, une étude de compétition avec des anticorps libres et des anticorps contrôles non spécifiques devrait être menée afin de valider la spécificité de la liaison cellulaire. De plus, une augmentation de la proportion de copolymères ciblés dans la formulation des PICMs permettrait également d'accroître davantage leur capture cellulaire.

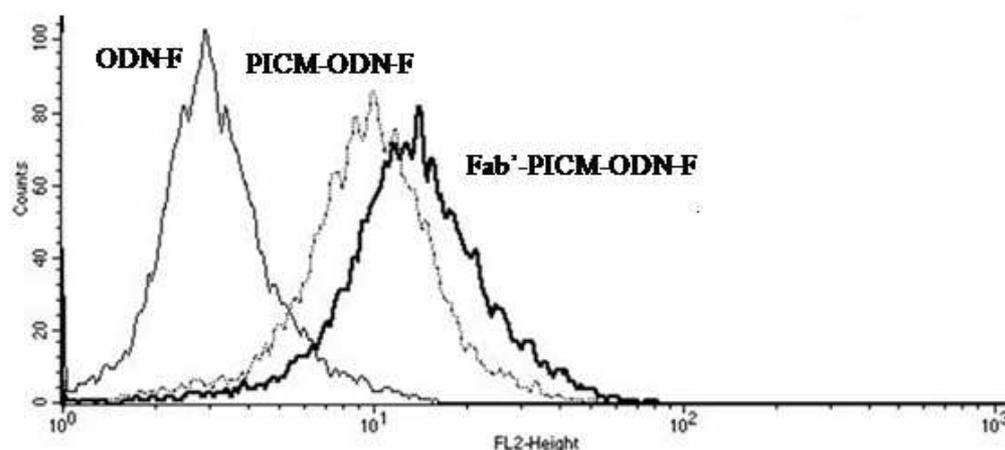


Figure 2.20. Capture cellulaire des micelles ciblées de Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉/PEG₆₈-b-PAEMA₂₄/ON-F et des micelles non ciblées de PEG₆₈-b-PAEMA₂₄/ON-F sur les cellules PC-3 évaluée par cytométrie de flux.

7. Conjugaison du Fab' à un copolymère anionique

Afin de démontrer la versatilité de la stratégie de couplage développée, cette méthodologie a été appliquée à un copolymère anionique, le thiol-poly(éthylène glycol)-b-poly(propyle méthacrylate-co-acide méthacrylique) (HS-PEG₁₄₅-b-P(PRMA₂₈-co-MAA₅₃)). Le pyridyl-S-S-PEG₁₄₅-b-P(PRMA₂₈-co-MAA₅₃) a été préparé puis conjugué à un fragment de Fab' selon la méthode décrite pour le copolymère cationique à la section 5.1.1. Le

produit final a été obtenu par une purification sur résine échangeuse d'anions ce qui permet de retenir seulement le copolymère anionique (conjugué et non conjugué au Fab'). Le taux de fonctionnalisation du copolymère par le fragment Fab'a été estimé par dosage BCA des protéines à ~15 %. Le rendement massique de copolymère était toutefois très faible (< 20 %). Un essai de capture cellulaire a démontré que les micelles préparées par le Fab'-S-S-PEG₁₄₅-*b*-P(PrMA₂₈-*co*-MAA₅₃) présentaient un taux de capture significativement supérieur à celui des micelles nues (Elsabahy *et al.* 2009). Ces résultats démontrent la versatilité de la méthode de couplage et renforcent l'hypothèse que des interactions électrostatiques entre le copolymère cationique et le fragment d'anticorps altèreraient le profil d'éluion du conjugué sur la résine échangeuse d'ions.

CHAPITRE III. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Alors que la thérapie génique a le potentiel de traiter diverses pathologies humaines, les essais cliniques démontrent qu'un vecteur efficace et spécifique pour la transfection d'ONs manque toujours. Les PICMs ont le potentiel de complexer l'ON et peuvent être utilisées en tant que vecteur pour des applications en thérapie génique. Leur manque de spécificité et leur confinement dans le compartiment endosomal à la suite de leur capture cellulaire limitent leur potentiel thérapeutique.

Ce travail de maîtrise avait pour but de mettre au point des PICMs incorporant un copolymère de type P(MAA₅₀-CO-EA₄₀-CO-BMA₁₀) dans leur composition (PICMs ternaires) et ciblées contre les récepteurs à la transferrine. Pour ce faire, une banque de copolymères cationiques a été préparée par PRTA. De cette banque, trois copolymères cationiques composés de 25 unités monomériques présentant des amines primaires, tertiaires et/ou les deux ont été sélectionnées pour la mise au point des micelles. L'analyse des propriétés physicochimiques de PICMs binaires et ternaires démontrent que ces systèmes lient efficacement les acides nucléiques, et ce, indépendamment de la nature du copolymère cationique et/ou de l'acide nucléique (ON-PS, FANA, pARNi). De plus, les résultats montrent que l'addition du copolymère d'acide méthacrylique aux PICMs permet de préparer des micelles de taille variant entre 21 et 33 nm et d'IP inférieur à 0,2. Ainsi, ces résultats supportent le potentiel et la versatilité d'application des PICMs ternaires pour le transport d'acide nucléique.

D'autre part, afin d'augmenter la spécificité et l'efficacité d'internalisation des PICMs, une méthodologie de couplage d'un fragment Fab' anti-CD71 à l'extrémité d'un copolymère cationique a été établie. Les résultats préliminaires suggèrent que les fragments Fab' sont bien conjugués aux copolymères cationiques, mais que les conditions de couplage et, plus particulièrement, le protocole expérimental de purification doivent être davantage optimisés. En effet, la conversion rapide du fragment Fab' en Fab₂ et la présence

d'interactions électrostatiques entre le copolymère cationique et le fragment Fab' nuirait à la conjugaison du ligand au copolymère ainsi qu'à sa purification sur résine échangeuse d'ion. Cette hypothèse est renforcée par les meilleurs résultats obtenus pour le couplage et le taux de capture cellulaire des micelles ciblées de Fab-S-S-PEG₁₄₅-*b*-P(PrMA₂₈-*co*-MAA₅₃), un copolymère anionique. Ces résultats démontrent également la versatilité de la méthode de couplage.

Les travaux futurs viseront à améliorer davantage la méthodologie de couplage et le protocole expérimental de purification pour le greffage d'une molécule de reconnaissance en bout de chaîne du copolymère cationique. Par exemple, la conjugaison directe du fragment Fab' à des micelles préformulées pourrait être une nouvelle approche. En effet, la couronne de PEG des micelles permettrait de masquer la charge apparente du système, ce qui minimiserait la présence d'interactions électrostatiques entre le copolymère cationique et l'anticorps. Cette approche est déjà utilisée dans la préparation de micelles ciblées non ioniques (Torchilin *et al.* 2003, Lukyanov et Torchilin 2004, Torchilin 2004). L'élaboration d'un protocole de purification basé sur la dialyse ou la chromatographie d'exclusion stérique serait également une nouvelle avenue à envisager. De plus, une fois la méthodologie de couplage optimisée, le système devra être testé dans des modèles cellulaires *in vitro* avant de pouvoir passer à l'administration *in vivo*. Par exemple, il faudrait tester la stabilité du pont disulfure, la proportion optimale de ligand à incorporer au système, la dose optimale d'ON ainsi que l'activité du polymère membrano-lytique une fois incorporé dans les micelles ternaires ciblées.

Bien que nos travaux présentent des résultats préliminaires, ces derniers sont prometteurs pour la mise au point de vecteur non-viral idéal qui pourra être un jour utilisé pour l'administration de matériel génétique.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, D.J., Rogers, S.H., *et al.* (2008) The effect of PEO block lengths on the size and stability of complex coacervate core micelles. *J Colloid Interface Sci*; 322: 448-56.

Bulaj, G., Kortemme, T., *et al.* (1998) Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry*; 37: 8965-72.

Carlsson, J., Drevin, H., *et al.* (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J*; 173: 723-37.

Cyrille Boyer, J.L., Lingjiun Wong , Michael Tippett , Volga Bulmus , Thomas P. Davis (2008) Stability and utility of pyridyl disulfide functionality in RAFT and conventional radical polymerizations. *J Polym Sci A Polym Chem*; 46: 7207-24.

De Martimprey, H., Vauthier, C., *et al.* (2009) Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: oligonucleotides and siRNA. *Eur J Pharm Biopharm*; 71: 490-504.

Dean, N.M., McKay, R., *et al.* (1994) Inhibition of protein kinase C-alpha expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J Biol Chem*; 269: 16416-24.

Deshpande, M.C., Garnett, M.C., *et al.* (2002) Influence of polymer architecture on the structure of complexes formed by PEG-tertiary amine methacrylate copolymers and phosphorothioate oligonucleotide. *J Control Release*; 81: 185-99.

Dong, H., Matyjaszewski, K. (2008) ARGET ATRP of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate as an intrinsic reducing agent. *Macromolecules*; 41: 6868-70.

Dufresne, I., Desormeaux, A., *et al.* (1999) Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-DR Fab' fragments. *Biochim Biophys Acta*; 1421: 284-94.

Dufresne, M.H., Elsabahy, M., *et al.* (2008) Characterization of polyion complex micelles designed to address the challenges of oligonucleotide delivery. *Pharm Res*; 25: 2083-93.

Dufresne, M.H., Gauthier, M.A., *et al.* (2005) Thiol-functionalized polymeric micelles: from molecular recognition to improved mucoadhesion. *Bioconjug Chem*; 16: 1027-33.

Dufresne, M.H., Leroux, J.C. (2004) Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin. *Pharm Res*; 21: 160-9.

Elsabahy, M., Wazen, N., *et al.* (2009) Delivery of nucleic acids through the controlled disassembly of multifunctional nanocomplexes. *Adv Funct Mater*; 19: 1-6.

Feldstein, M.M., Kiseleva, T.I., *et al.* (2009) Mechanisms of molecular interactions in polybase–polyacid complex formed by copolymers of N,N-dimethylaminoethylmethacrylate with alkylmethacrylates and methacrylic acid with ethylacrylate. *Appl Polym Sci*; 112: 1142–65.

Fischer, H. (2001) The persistent radical effect: a principle for selective radical reactions and living radical polymerizations. *Chem Rev*; 101: 3581-610.

Garnett, M.C. (2001) Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev*; 53: 171-216.

Geiger, T., Muller, M., *et al.* (1998) Antitumor activity of a PKC- α antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice. *Anticancer Drug Des*; 13: 35-45.

Glodde, M., Sirsi, S.R., *et al.* (2006) Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides. *Biomacromolecules*; 7: 347-56.

He, L., Read, E.S., *et al.* (2007) Direct synthesis of controlled-structure primary amine-based methacrylic polymers by living radical polymerization. *Macromolecules*; 40: 4429–38.

Humphreys, D.P., Heywood, S.P., *et al.* (2007) Alternative antibody Fab' fragment PEGylation strategies: combination of strong reducing agents, disruption of the interchain disulphide bond and disulphide engineering. *Protein Eng Des Sel*; 20: 227-34.

Jeong, J.H., Lee, M., *et al.* (2005) Anti-GAD antibody targeted non-viral gene delivery to islet beta cells. *J Control Release*; 107: 562-70.

Jin, J., Achenbach, J.C., *et al.* (2005) Complexation of well-controlled low-molecular weight polyelectrolytes with antisense oligonucleotides. *Colloid Polym Sci*; 283: 1197-205.

Jones, R.A., Poniris, M.H., *et al.* (2004) pDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. *J Control Release*; 96: 379-91.

- Kabanov, A.V., Bronich, T.K., *et al.* (2003) Soluble Stoichiometric Complexes from Poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium) Cations and Poly(ethylene oxide)-block-polymethacrylate Anions. *Macromolecules*; 29: 6797-802.
- Kong, W.H., Sung, D.K., *et al.* (2009) Efficient intracellular siRNA delivery strategy through rapid and simple two steps mixing involving noncovalent post-PEGylation. *J Control Release*; 138: 141-7.
- Lu, Z.R., Kopeckova, P., *et al.* (1999) Polymerizable Fab' antibody fragments for targeting of anticancer drugs. *Nat Biotechnol*; 17: 1101-4.
- Lukyanov, A.N., Torchilin, V.P. (2004) Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev*; 56: 1273-89.
- Matyjaszewski, T.E.P.a.K. (1998) Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials. *Adv Mater*; 10: 901-15.
- Merdan, T., Callahan, J., *et al.* (2003) Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug Chem*; 14: 989-96.
- Oishi, M., Kataoka, K., *et al.* (2006) pH-responsive three-layered PEGylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector. *Bioconjug Chem*; 17: 677-88.
- Prádný, M., SevEik, S. (1987) Precursors of hydrophilic polymers, 7: Potentiometric properties and structure of copolymers of 2-dimethylaminoethyl methacrylate. *Makromol Chem* 188
- Ranger, M. (2001) From Well-Defined Diblock Copolymers Prepared by a Versatile Atom Transfer Radical Polymerization Method to Supramolecular Assemblies. *J Polym Sci A Polym Chem* ; 39: 3861-74.
- Read, E.S., Thompson, K.L., *et al.* (2010) Synthesis of well-defined primary amine-based homopolymers and block copolymers and their Michael addition reactions with acrylates and acrylamides. *Polym Chem*; 1 221-30.
- Reschel, T., Konak, C., *et al.* (2002) Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. *J Control Release*; 81: 201-17.

Rungsardthong, U., Ehtezazi, T., *et al.* (2003) Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems. *Biomacromolecules*; 4: 683-90.

Sundaram, S., Lee, L.K., *et al.* (2007) Interplay of polyethyleneimine molecular weight and oligonucleotide backbone chemistry in the dynamics of antisense activity. *Nucleic Acids Res*; 35: 4396-408.

Tang, W., Tsarevsky, N.V., *et al.* (2006) Determination of Equilibrium Constants for Atom Transfer Radical Polymerization. *J Am Chem Soc*; 128: 1598-604.

Thompson, K.L., Read, E.S., *et al.* (2008) Chemical degradation of poly(2-aminoethyl methacrylate). *Polym Degrad Stab*; 93: 1460-6.

Torchilin, V.P. (2000) Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*; 11 Suppl 2: S81-91.

Torchilin, V.P. (2007) Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*; 24: 1-16.

Torchilin, V.P. (2004) Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell Mol Life Sci*; 61: 2549-59.

Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., *et al.* (2003) Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 6039-44.

van de Wetering, P., Moret, E.E., *et al.* (1999) Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjug Chem*; 10: 589-97.

Van Dijk-Wolthuis, W.N., Van de Wetering, P., *et al.* (1999) A versatile method for the conjugation of proteins and peptides to poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]. *Bioconjug Chem*; 10: 687-92.

Wakebayashi, D., Nishiyama, N., *et al.* (2004) Polyion complex micelles of pDNA with acetal-poly(ethylene glycol)-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) block copolymer as the gene carrier system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficacy. *Biomacromolecules*; 5: 2128-36.

Wang, L., Kristensen, J., *et al.* (1998) Delivery of antisense oligonucleotides using HEMA polymer: synthesis of a thiol polymer and its conjugation to water-soluble molecules. *Bioconjug Chem*; 9: 749-57.

Won, Y.Y., Sharma, R., *et al.* (2009) Missing pieces in understanding the intracellular trafficking of polycation/DNA complexes. *J Control Release*; 139: 88-93.

Xia, K.M.a.J. (2001) Atom transfer radical polymerization. *Chem Rev*; 101: 2921-90.

Yessine, M.A., Dufresne, M.H., *et al.* (2007) Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles. *Bioconjug Chem*; 18: 1010-4.

Yessine, M.A., Lafleur, M., *et al.* (2003) Characterization of the membrane-destabilizing properties of different pH-sensitive methacrylic acid copolymers. *Biochim Biophys Acta*; 1613: 28-38.

You, J.O., Auguste, D.T. (2010) The effect of swelling and cationic character on gene transfection by pH-sensitive nanocarriers. *Biomaterials*; 31: 6859-66.

CHAPITRE IV. PARTIE EXPÉRIMENTALE

4.1 . Matériel

Le MeO-PEG-OH (3000 g/mol) a été acheté chez Nektar (Huntsville, AL) et les monomères d'AEMA·HCl et de DMAEMA ont été obtenus chez Polysciences Inc. (Warrington, PA). Le DMAEMA a été distillé sous vide avant son utilisation afin d'éliminer toutes traces d'inhibiteur de polymérisation. Le P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) (M_n: 19 800 g/mol; IP : 1,31) a été fourni par Röhm GmbH (Darmstadt, Germany). Ce dernier a été synthétisé par polymérisation radicalaire employant le dodécyle mercaptan comme agent de transfert. Avant son utilisation, le copolymère a été solubilisé dans l'éthanol et dialysé contre de l'eau millipore durant cinq jours.

L'ON-PS modèle utilisé dans ce mémoire est l'ON-3521 (ISIS 3521) (5'-GTTCTGGCTGGTGAGTTTCA-3'). L'ON-3521, ainsi que son analogue marqué à la fluorescéine en position 5', ont été synthétisés chez Medicorp Inc. (Montréal, QC, Canada). Le pARNi (5'-GCUUGAAGUCUUUAAUAAtt-3'), le FANA (5'-fa(CAA)d(CGT)fa(TTC)d(GGA)fa(CCG)d(TAT)fa(TTC)-3') et son analogue phosphorothioate (ON-P) (d(CAAG_sTTCGGACCGTATTTC)) ont gracieusement été synthétisés par le Pr. M. J. Damha (Université McGill, Montréal, QC, Canada). L'ON, utilisé lors de l'essai d'internalisation des micelles, et son analogue marqué à la fluorescéine en position 5' (5'-TGAAACTCACCAGCGAGAAC) ciblant le codon initial du Bcl-2 ARNm ont été synthétisés par Alpha BDA (Montréal, QC, Canada).

La trousse de préparation des anticorps murins IgG, Fab' et Fab₂ a été obtenue chez Pierce (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). L'anticorps anti-CD71 a été fourni par Invitrogen (Burlington, ON, Canada). La résine échangeuse de cations (Hi-Trap Sp Hp, 1mL), les colonnes de Sephadex G-25 et les colonnes de Sephadex PD-10 ont été obtenues chez GE Healthcare Bio-Sciences Inc. (Baie d'Urfé, Qc, Canada). La trousse de dosage des protéines à l'acide bicinchronique (BCA) a été achetée chez Pierce (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Tous les autres produits ont été fournis par Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) et ont été utilisés sans purification, à l'exception du THF qui a été déshydraté

sur une colonne PureSolv™ (Innovative Technologies, Newburyport, MA), et de la triéthylamine qui a été distillée en présence d'hydrure de calcium.

4.2 Résonance magnétique nucléaire du proton (¹H RMN)

Les ¹H RMN ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker NMR opérant à 300 ou à 700 MHz (Bruker, Milton, ON, Canada). Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au chloroforme deutéré (CDCl₃) ou à l'eau deutérée (D₂O), à température ambiante.

4.3. Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

Les masses molaires en nombre (M_n), les masses molaires en poids (M_p) et l'indice de polymolécularité (IP) ont été déterminés par CES à l'aide d'un système Alliance GPCV 2000 (Waters, Milford, MA) composé de trois colonnes aqueuses de types Styragel placées en série (HR1, HR2 et HR4), d'un réfractomètre différentiel (Waters 2410) et d'un détecteur PD 2000 de diffusion de la lumière (Precision Detectors, Franklin, MA). Les analyses ont été conduites dans le THF (grade HPLC), à un débit de 1,0 mL/min et une température de 40°C. Une courbe d'étalonnage a été préparée à partir de standards de PEG de masse molaire connue.

4.4. Diffusion de la lumière en mode dynamique (DLD)

Le rayon hydrodynamique moyen, l'IP et l'intensité de la lumière diffusée (Kcps) ont été déterminés par DLD à l'aide d'un Malvern Zetasizer Nanoseries ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Les analyses ont été effectuées à un angle de 173°, à 25°C. La distribution de taille a été extraite en utilisant le programme CONTIN basé sur une fonction d'autocorrélation.

4.5. Analyse élémentaire

Les analyses ont été menées par le département de chimie de l'Université de Montréal et ont été enregistrées sur un Fisons Instruments SPA, modèle EA1108. Les analyses ont été effectuées sous atmosphère oxydative à 1021 °C.

4.6. Titrage potentiométrique

Le titrage potentiométrique a été effectué en utilisant un pH-mètre Accumet AP61 portable (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada). Les copolymères ont été préalablement solubilisés à 1 mg/mL dans de l'eau millipore et la solution acidifiée jusqu'à un pH de ~2,7 (HCl à 0,01 N) afin d'assurer la complète ionisation et la dissolution du copolymère. La variation du pH a été mesurée à la suite de l'addition séquentielle de 0,005 M NaOH. Le pK_a apparent a été calculé selon l'équation 1:

$$pK_a = pH - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad [1]$$

Où α est défini par (C_N^+ / C_m) , où C_N^+ représente la concentration d'amines protonées et C_m , la concentration monomérique en unités de méthacrylate. En émettant l'hypothèse que tous les groupements amine sont déprotonés suite à l'ajout de NaOH, C_N^+ peut être estimée en utilisant la quantité de NaOH ajoutée (Lee *et al.* 1999; Ravi *et al.* 2003 Dufresne et Leroux 2004).

4.7. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LCMS-TOF)

L'analyse LCMS-TOF a été conduite sur un système 1100 LC couplé à un spectromètre de masse ESI-MSD-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) sur une colonne Poroshell 300SB-C8, 2,1 x 75 mm, 5 μ m (Agilent Technologies, Wilmington, DE) maintenue à 50°C, à un débit de 0,5 mL/min. Un gradient d'acétonitrile a été utilisé pour l'élution. La phase organique et la phase aqueuse contenaient 0,1 % de TFA. La concentration en acétonitrile a été augmentée de 20 à 70 % sur une période de 20 min, de 70 à 90 % sur une période de 2 min, puis maintenue à l'équilibre durant 1 min. Le

spectromètre de masse a été opéré à l'aide d'un électrospray positif. Les spectres ont été analysés sur une échelle de 100 à 3500 m/z avec un cycle d'acquisition de 0,89 sec et une résolution supérieure à 10 000. Le voltage de l'électrospray était de 4 kV et celui du fragmentateur était de 150 V. La température était de 350 °C.

4.8. Synthèse du méthacrylate de 2-(N-(*tert*-butoxycarbonyl)aminoéthyle (AEMABoc)

La synthèse du AEMABoc a été décrite par Dufresne *et al.* (2004). L'AEMA·HCl (1,1 éq) a été dissout dans du dichlorométhane (DCM) anhydre (0,30 M) et agité durant 10 min à 0 °C. De la triméthylamine fraîchement distillée (1,1 éq) a été ajoutée goutte-à-goutte au milieu réactionnel et la solution agitée durant 20 min à 0 °C. Une solution de di-*tert*-butyle-dicarbonat (1,1 éq) dans un minimum de DCM a été ajoutée au milieu réactionnel. La solution a été agitée durant 24 h à température ambiante. Le AEMABoc a été purifié par trois lavages successifs de la phase organique avec une solution de 1 M HCl, puis avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et finalement avec une solution saline saturée. Le solvant a été évaporé sous vide et le produit finale a été obtenu par recristallisation (rendement: 85 %).

AEMABoc ¹H RMN (CDCl₃) (δ, ppm) : 6,10 (d, 1 H); 5,60 (t, 1 H), 4,82 (s, 1 H), 4,20 (t, 2 H), 3,45 (q, 2 H), 2,0 (s, 3 H), 1,50 (s. 9 H)

4.9. Synthèse du α-*tert*-butanethio-ω-hydroxyl poly(éthylène glycol) (tBu-S-PEG-OH)

Le *tert*-butyle mercaptan a été utilisé comme initiateur de la polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène (OE) en présence de naphthalène de potassium, tel que décrit par Dufresnes *et al.* 2005. Le naphthalène potassium (0,5 éq.; 0,69 mmol) et le *tert*-butyle mercaptan (1 éq.; 1,39 mmol) ont été dissous dans du THF anhydre (7 mL). Les produits ont été purgés 10 min sous argon. L'OE (77 éq.; 0,11 mol) a été par la suite canulé dans le milieu réactionnel. À cette fin, l'OE gazeux a, dans un premier temps, été condensé dans un ballon sous argon à – 70 °C. L'OE liquide a par la suite été canulé dans le milieu

réactionnel sous argon et en ramenant tranquillement la température de l'OE à la température ambiante. La polymérisation a été conduite durant 48 h à température ambiante. Le produit final a été isolé par précipitation dans l'éther diéthylique froid. L'analyse ^1H RMN du polymère a été conduite dans une solution de CDCl_3 en présence de quelques gouttes d'anhydride trifluoroacétique (7,5 % *v/v*), afin de permettre le déplacement chimique du signal du groupement méthylène adjacent au groupement hydroxyle terminal (Jo *et al.* 2001). L'intégration du signal méthylène adjacent au soufre et du signal méthylène adjacent à l'hydroxyle a permis d'évaluer le degré de fonctionnalisation du copolymère par la fonction tBu-mercaptop.

(tBu-S-PEG-OH) ^1H RMN (CDCl_3) (δ , ppm) : 4,52 (t, 2H), 3,66 (m, 320 H), 2,75 (t, 2H), 1,30 (s, 9 H)

4.10. Synthèse des macroamorceurs de polymérisation radicalaire par transfert d'atome (PRTA) : le α -(2-bromoisobutyrylate)- ω -méthoxy PEG (MeO-PEG-Br) et *tert*-butyle- α -(2-bromoisobutyrylate)- ω -méthoxy PEG (tBu-S-PEG-Br)

La méthode générale de conversion du PEG en macroinitiateur a été décrite par Ranger *et al.* (2001). De la triméthylamine (10 éq. ; 30 mmol) a été ajouté à une solution de PEG à 100 g/L (1 éq.; 3 mmol) dans du THF anhydride et la solution agitée 10 min à température ambiante. Le 2-bromoisobutyryl bromide (4 éq. ; 12 mmol) a été ajouté goutte-à-goutte à la solution. Le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 48 h, après quoi le milieu réactionnel a été dilué dans du DCM et la phase organique lavée successivement avec une solution de 10 % HCl, 1 N NaOH et finalement une solution saline saturée. Le MeO-PEG-Br et le tBu-S-PEG-Br ont été obtenus par précipitation dans l'éther diéthylique froid (rendement 70 %).

a) **PEG-Br** ^1H RMN (CDCl_3) (δ , ppm) : 4,30 (t, 2 H); 3,63 (m, 272 H), 3,40 (s, 3 H), 1,95 (s, 6 H).

b) **tBu-S-PEG-Br** ^1H RMN (CDCl_3) (δ , ppm) : 4,52 (t, 2H), 3,66 (m, 320 H), 4,29 (t, 2 H), 2,75 (t, 2H), 1,85 (s, 6 H), 1,30 (s, 9 H)

4.11. Synthèse du copolymère bloc cationique par PRTA

Les copolymères blocs préparés à partir du macroamorceur MeO-PEG-Br ont été synthétisés avec les monomères AEMABoc, DMAEMA ou un mélange des deux. Le Cu(I)Br (1,1 éq.) et le HMTETA (1,1 éq.) ont été placés dans un deuxième ballon et les produits ont également été purgés avec de l'argon durant 15 min. Parallèlement, le MeO-PEG-Br (1 éq.) et 25 éq. de monomère ont été dissouts dans du THF pour obtenir une concentration finale en monomère de 0,8 M. La solution a été purgée avec de l'argon durant 15 min. Ces derniers ont été transférés, sous argon, à la solution de monomères. La copolymérisation a été conduite à 65 °C durant 20 h, puis arrêtée en diluant le milieu réactionnel avec une solution d'éthanol/THF (10 %). Le polymère a été purifié sur silice, utilisant le THF entant qu'éluant, afin d'éliminer le cuivre. La phase organique a été évaporée sous pression réduite et le produit a été redissout dans un minimum de ETOAc et lavée avec une solution de 3 N HCl dans l'ETOAc afin obtenir la forme ionisé du copolymère. Le copolymère a été dialysé (Spectra/Por MWCO 6000-8000) contre de l'eau durant 48 h. Le copolymère pur a été obtenu suite à la lyophilisation de la solution.

Les copolymères blocs possédant des groupements amines primaires (AEMABoc) ont été déprotégés en diluant le copolymère (50 mg/mL) dans une solution de 3 M HCl dans l'ETOAc. La solution a été agitée durant 1 h à température ambiante, le produit final purifié par dialyse puis lyophilisé.

Les copolymères préparés à partir du tBu-S-PEG-Br macroinitiateur ont également été synthétisés selon cette même méthode et ceux possédants des groupements amines primaires ont été déprotégé simultanément avec le groupement thiol en dilant le copolymère (20 mg/ml) dans une solution de TFA/DMSO (85 :15). La solution été agitée durant 20 min et le produit final purifié par dialyse puis lyophilisé.

a) PEG₆₈-b-PAEMA₂₄ $M_n = 7200$; $M_p/M_n = 1,07$; $^1\text{H RMN (D}_2\text{O)}$ (δ , ppm) : 4,25 (s, 52 H); 3,65 (m, 272 H); 3,34 (s, 3 H); 3,22 (s, 54 H); 2,0 (m, 42 H); 1,2-0,80 (s, 6 H; m, 77 H).

b) PEG₆₈-b-PDMAEMA₂₅ $M_n = 6300$; $M_p/M_n = 1,05$; $^1\text{H RMN (D}_2\text{O)}$ (δ , ppm) : 4,25 (s, 50 H); 3,66 (m, 272 H); 3,40 (s, 3 H); 3,20 (s, 58 H); 2,70 (s, 156 H); 1,96-1,82 (m, 50 H); 1,15-0,80 (s, 6 H; m, 73 H).

c) PEG₆₈-b-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁) $M_n = 6400$; $M_p/M_n = 1,07$; $^1\text{H RMN (D}_2\text{O)}$ (δ , ppm) : 4,42 (s, 53 H); 3,66 (m, 272 H); 3,40 (s, 26 H); 3,25 (s, 29 H); 2,85 (m, 72 H); 2,0-1,6 (brs, 42 H); 1,1-0,8 (brs, 84 H).

d) tBu-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ ($M_n = 7800$); $M_p/M_n = 1,13$; $^1\text{H RMN (D}_2\text{O)}$ (δ , ppm) : 4,22 (brs, 24 H); 3,66 (s, 320 H); 3,29 (brs, 31 H); 1,32 (s, 9H); 1,38-0,88 (s, 51 H).

4.12. Synthèse du pyridyle-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉

Le copolymère thiolé a été fraîchement réduit avant sa conjugaison avec l'aldrithiol. À cette fin, le HS-PEG₈₀-b-P(AEMA₁₉) (5 mg/mL) a été dissous dans du tampon phosphate contenant du dithiothréitol (DTT) 50 mM. La solution a été purgée sous argon durant 5 min puis agitée à température ambiante durant 4 h. Le polymère thiolé a été purifié sur une colonne Sephadex PD-10 sous argon et élué dans du tampon phosphate salin (PBS) dégazé sous argon. Le profil d'éluion du copolymère sur la colonne de Sephadex PD-10 a préalablement été établi. Les fractions contenant le copolymère ont été combinées puis ajoutées à une solution de 2-aldrithiol dans de l'éthanol (25 mg/mL). La réaction de conjugaison a été conduite à température ambiante durant 24 h. L'absorbance de la solution à 343 nm (sel de thiopyridone) a été suivie au cours de la réaction. Après 24 h, la solution a été évaporée à sec sous vide. Le copolymère solide a été lavé avec de l'éther diéthylique froid et centrifugé à 4000 g durant 20 min. Une fois le surnageant retiré, le copolymère a été lavé une seconde avec de l'éther diéthylique puis centrifugé afin d'éliminer un maximum d'aldrithiol libre. Le copolymère a ainsi été lavé et centrifugé trois fois. Le produit final a été dissout dans un minimum d'eau millipore et passé sur une colonne de Sephadex G-25 (1,5 x 18 cm). Le produit final a été lyophilisé et caractérisé par $^1\text{H RMN}$ (rendement : 70 %).

pyridyle-S-S-PEG₈₀-b-P(AEMA₁₉) ¹H RMN (D₂O) (δ, ppm) : 8,27 (s, 1 H); 7,79-7,75 (d, 2 H), 7,18 (s, 1 H); 4,12 (brs, 25 H); 3,66 (s, 320 H); 3,20 (brs, 31 H); (1,89-0,80 (m, 50 H)

4.13. Synthèse du conjugué Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉

Le fragment d'anticorps Fab₂ a été préparé selon le protocole de la trousse de préparation des anticorps murins IgG, Fab' et Fab₂. La quantité de Fab₂ obtenue a été déterminée par dosage de protéine à l'aide de l'acide bicinchronique (BCA). La solution de Fab₂ a été par la suite concentrée et transférée dans du tampon PBS 35 mM, 0,15 M NaCl, pH 6,0. La solution de Fab₂ a été ajoutée à une solution de MEA-HCl dans un tampon PBS pH 6,0 (concentration finale de MAE-HCl de 0,05 M). La solution a été purgée durant 5 min sous argon puis incubée à 37 °C durant 90 min. Le Fab' fraîchement réduit a été purifié, sous argon, sur une colonne de Sephadex PD-10 et les fractions d'élution contenant le Fab' ont été rapidement concentrées sur un centrions (MWCO 100 kDa) à 4000 g durant 5 min. Le Fab' obtenu a été maintenu en tout temps sous argon. La solution de Fab' (2 éq.) fraîchement réduite a été rapidement ajoutée à une solution de pyridyle-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ (1 éq). La réaction de couplage a été réalisée à température ambiante, sous agitation durant 24 h. Le milieu réactionnel a ensuite été appliqué sur une résine échangeuse de cations (Hi-Trap SP HP, 1 mL). La colonne a été lavée avec 5 ml de tampon PBS 35 mM, 0,15 M NaCl, pH 6,0 afin d'éliminer le Fab' non réagit. Le conjugué Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₉ ensuite élué avec un tampon PBS 35 mM, 3 M NaCl, pH 6,0 à un débit de 1 mL/min. Les fractions contenant le Fab' ont été concentrées sur centricon et reconstituées dans le tampon de choix.

4.14. Préparation des micelles polyioniques (PICMs) binaires

Les copolymères cationiques (PEG₆₈-b-PAEMA₂₄, PEG₆₈-b-PDMAEMA₂₅ ou PEG₆₈-b-P(AEMA₁₃-co-DMAEMA₁₁) et l'acide nucléique (ON-3521, FANA, ON-P ou le pARNi) ont été solubilisés séparément dans un tampon Tris 10 mM pH 7,4, à une concentration de 2 mg/mL et 1 mg/mL, respectivement. Les PICMs ont été préparés à différents ratios N/P variant de 0 à 2. Les PICMs ont été formées suite à l'addition séquentielle de la solution de copolymère cationique à la solution d'acide nucléique. Le

diamètre hydrodynamique, l'IP et l'intensité de la lumière diffusée ont été obtenus par DLD. Les mesures ont été effectuées après une incubation de 15 min après chaque nouvelle addition de copolymère. Le ratio N/P idéal a été déterminé comme étant celui qui donnait des PICMs de faible IP, d'intensité de la lumière diffusée maximale et de petite taille. Les solutions de copolymère et d'acide nucléique, ainsi que le tampon Tris, ont préalablement été filtrés sur un filtre de nylon (0,22 μm) avant leur utilisation.

4.15. Préparation de PICMs ternaires

Une méthode similaire à celle des PICMs binaires a été utilisée afin de déterminer le ratio N/(P+COOH) idéal des PICMs ternaires. Dans un premier temps, une quantité croissante de P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) (0,1 mg/mL) a séquentiellement été ajoutée à une solution de copolymère cationique (1 mg/mL). Les complexes ont été incubés 10 min sous faible agitation, après quoi la taille, l'IP et l'intensité de la lumière diffusée ont été mesurés par DLD afin de déterminer le ratio N/COOH idéal. La formulation a ensuite été ajustée afin d'inclure 10 % (*p/p*) d'acide nucléique. Les micelles ont été incubées 15 min supplémentaires après l'addition de l'acide nucléique. Les solutions de copolymère cationique et anionique, la solution d'ON, ainsi que le tampon Tris pH 7.4 ont été filtrés sur un filtre de nylon (0,22 μm) avant leur utilisation.

4.16. Préparation de PICMs ciblées

Des micelles binaires de PEG_{68-b}-PAEMA₂₄ contenant 2 % de Fab'-S-S-PEG_{95-b}-PAEMA₁₉ (fonctionnalisé à 7%) ont été préparées à un ratio N/P de 1,5 dans du tampon Tris 10 mM pH 7,4. À cette fin, le PEG_{68-b}-PAEMA₂₄ et le Fab'-S-S-PEG_{95-b}-PAEMA₁₉ ont séquentiellement été ajoutées à une solution d'ON 3521 à 1 mg/mL (dont, 40 % était marqué au Cy-3). Les micelles ont été incubées à température ambiante, sous agitation, pendant 20 min. La formulation a été ajoutée aux cellules avec 0,3 mL de milieu de culture (concentration finale en ON était de 400 nM).

Les PICMs ternaires ciblées 2 % de Fab'-S-S-PEG_{95-b}-PAEMA₁₉ (fonctionnalisé à 7 %) ont été préparées à un ratio N/(P+COOH) de 1,1 dans du tampon Tris 10 mM pH 7,4. Dans un premier temps, le PEG_{68-b}-PAEMA₂₄ et le Fab'-S-S-PEG_{95-b}-PAEMA₁₉ ont

séquentiellement été ajouté à une solution de P(MAA_{50-co}-EA_{40-co}-BMA₁₀) (1 mg/mL). Les micelles ont été incubées à température ambiante, sous agitation, pendant 20 min. Puis, une solution d'ON 3521 à 1 mg/mL (dont, 40 % était marqué au Cy-3) a été ajoutée à la formulation. Cette dernière a été incubée à température ambiante, sous agitation, pendant 20 min.

4.17. Incorporation d'acides nucléiques dans les PICMs binaires et ternaires par gel électrophorèse

Les PICMs binaires et ternaires ont été préparées dans un tampon Tris 10 mM pH 7,4 avec l'ON-3521 (avec 20 % des chaînes d'ON marquées à la fluorescéine) ou le pARNi (avec 25 % des chaînes de pARNi marquées à la fluorescéine). La contribution de l'acide nucléique représente 10 % (*p/p*) de la composition massique des micelles ternaires. Les PICMs binaires et ternaires ont été préparées à des ratios N/P et N/(P+COOH) variant de 0,25 à 2. Les formulations ont été appliquées sur un gel d'acrylamide 20 % (*p/v*), préparé à partir de tampon acide tris-borate-éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à pH 7,4. La migration du gel a été effectuée à 500 mA, 150V, durant 1 h. À la fin de la migration, la fluorescence de l'acide nucléique (ON-F ou pARNi-F) a été révélée par irradiation UV avec un ChemiImager 5500 imaging system (Alpha Innotech Corp., San Leandro CA). La fluorescence du pARNi a été analysée en utilisant un appareil TyphoonTM 9410 Workstation (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA).

4.18. Incorporation de l'ON dans des PICMs binaires et ternaires par complexation avec le bromure d'éthidium (BrEt)

Des PICMs binaires et ternaires ont été préparées à des ratios N/P et N/(P+COOH) variant de 0,25 à 2 dans un tampon Tris 10 mM pH 7,4 avec l'ON 3521 (1 mg/mL). Les formulations ont ensuite été incubées avec du BrEt (1 éq. par base d'ON) durant 30 min, dans l'obscurité. La fluorescence émise à la suite de la complexation de l'BrEt et de l'ON libre a été estimée à l'aide d'un Safire Reader (Tecan, Medford, MA: $\lambda_{\text{ex}} = 523 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$). La fluorescence relative est calculée à partir de l'équation 2 :

$$\text{Fluorescence relative} = \frac{(F_{\text{PICM}} - F_i)}{(F_o - F_i)} \times 100 \quad [2]$$

où F_i , F_o et F_{PICM} représentent la fluorescence de l'BrEt libre, du complexe ON/BrEt et des micelles en présence de BrEt (à différents ratios), respectivement.

4.19. Évaluation de la stabilité des PICMs binaires et ternaires (essai de compétitivité avec l'héparine)

Des PICMs binaires constituées des copolymères de PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄, PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅ ou PEG-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁) ont été préparées dans du tampon Tris 10 mM pH 7,4 à un ratio N/P de 1,5 avec l'ON-3521. Parallèlement, des PICMs ternaires ont été préparées au ratio N/(P+COOH) de 1,1 pour le PEG₆₈-*b*-PAEMA₂₄ et le PEG₆₈-*b*-PDMAEMA₂₅, et de 1,2 pour le PEG-*b*-P(AEMA₁₃-*co*-DMAEMA₁₁). La concentration finale d'ON dans les PICMs binaires et ternaires était de 2,75 µg/mL. Les formulations ont été déposées dans une plaque de 96 puits et incubées avec le BrEt (1 éq. par base de l'ON) dans l'obscurité. Après 30 min, une quantité croissante d'héparine (forme sodique extraite de la muqueuse intestinale de porc ; $M_n \sim 3000$ g/mol) a été ajoutée aux formulations, et l'incubation a été renouvelée pour 1 h. La déstabilisation des micelles par l'héparine a été estimée en mesurant la fluorescence émise suite à la complexation de l'ON, libéré, avec l'BrEt. La fluorescence a été mesurée à l'aide d'un *Safire reader* (Tecan, Medford, MA: $\lambda_{\text{ex}} = 523$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 587$ nm). La fluorescence relative peut être calculée à partir de l'équation 3.

$$\text{Fluorescence relative} = \frac{(F_{\text{PICM}} - F_i)}{(F_o - F_i)} \times 100 \quad [3]$$

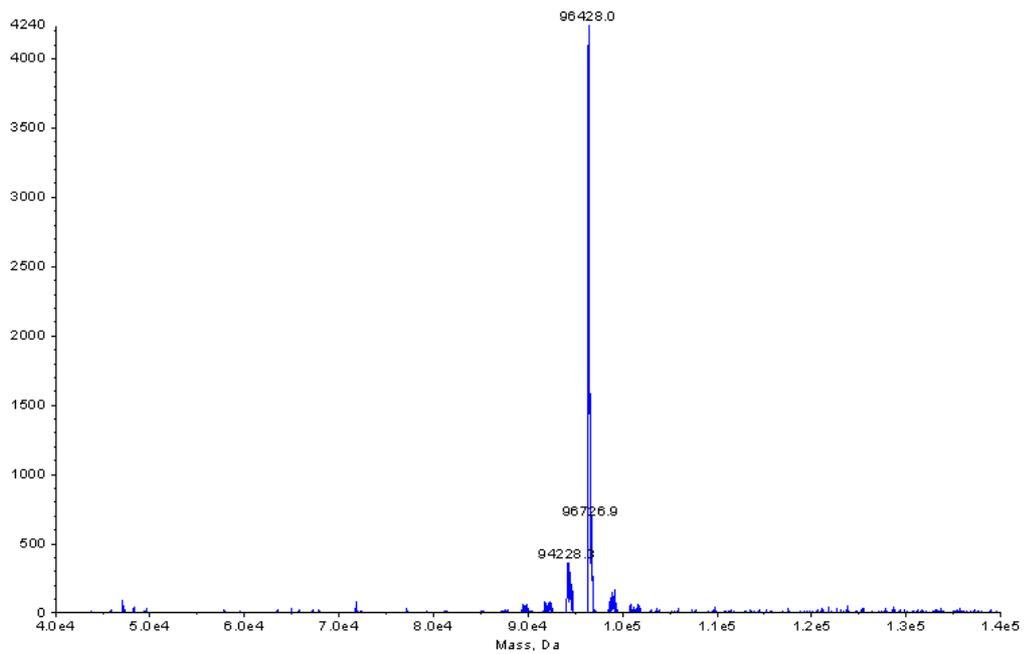
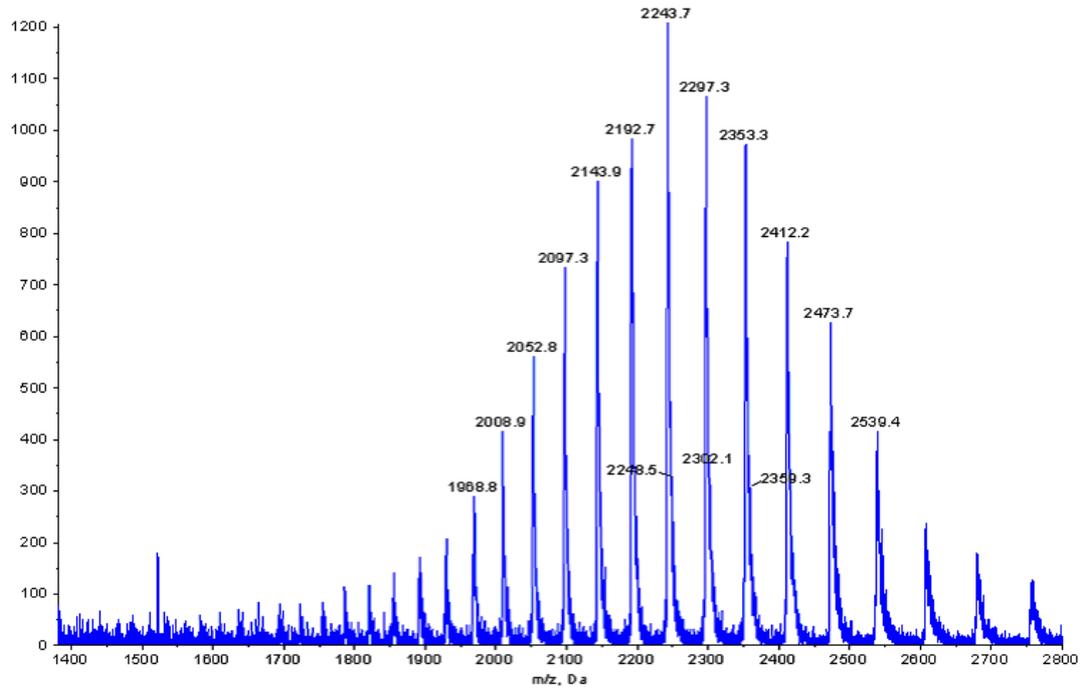
où F_i , F_o et F_{PICM} représentent la fluorescence de l'BrEt libre, du complexe ON/BrEt et des micelles en présence d'héparine (à différents ratios), respectivement.

4.20. Capture cellulaire des micelles

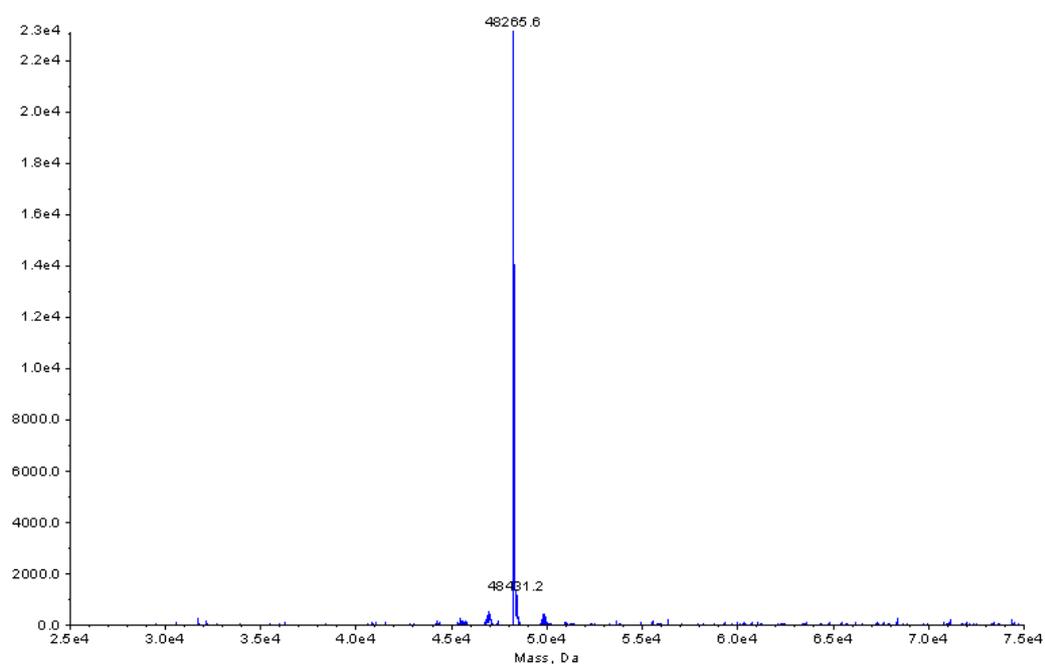
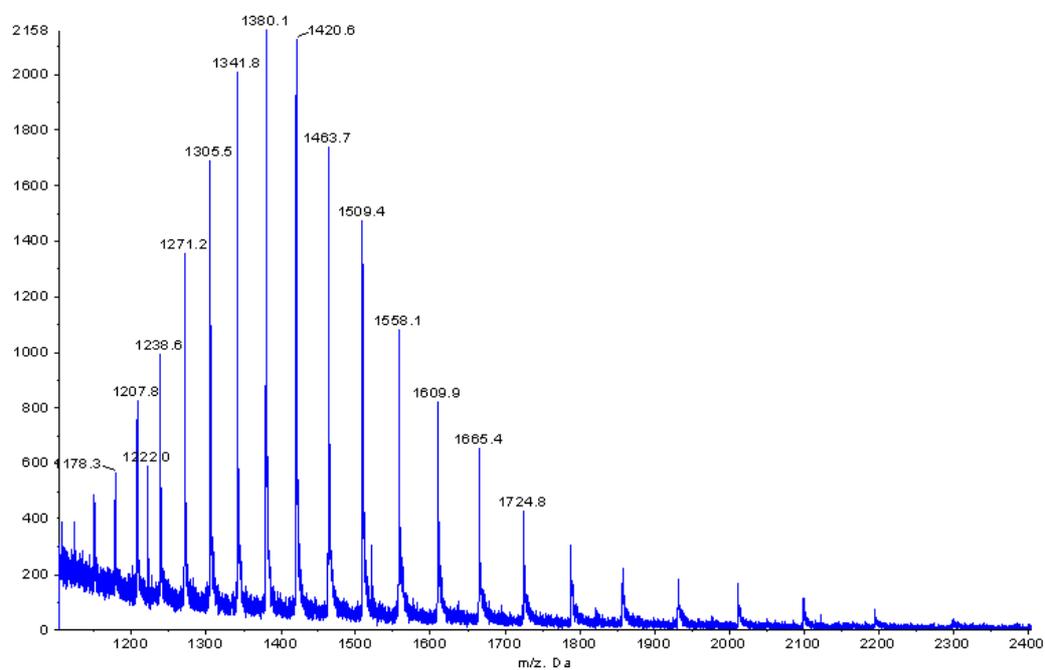
L'essai de capture des formulations micellaires et l'analyse par cytométrie en flux ont été effectués tel que décrit par Elsabahy *et al.* (2009). Des cellules cancéreuses de la

prostate (PC-3; 3×10^5 cellules dans 1 mL de milieu) ont été déposées dans des plaques de 24 puits et incubées 24 h à 37 °C sous atmosphère contrôlée (5% de CO₂). Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec 1 mL d'Opti-MEM^(MC) puis incubées sous agitation à 37°C avec 0,3 mL de milieu et 0,1 mL de micelles binaires ciblées ou non. La concentration finale d'ON dans les formulations était de 400 nM. Après 2 h, les cellules ont été lavées avec du tampon PBS, fixées avec une solution de formaldéhyde (1% v/v dans du PBS) et lavées une dernière fois avec du PBS. La capture cellulaire a été estimée en mesurant l'intensité de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm) de 10 000 cellules à l'aide d'un cytomètre en flux de type FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

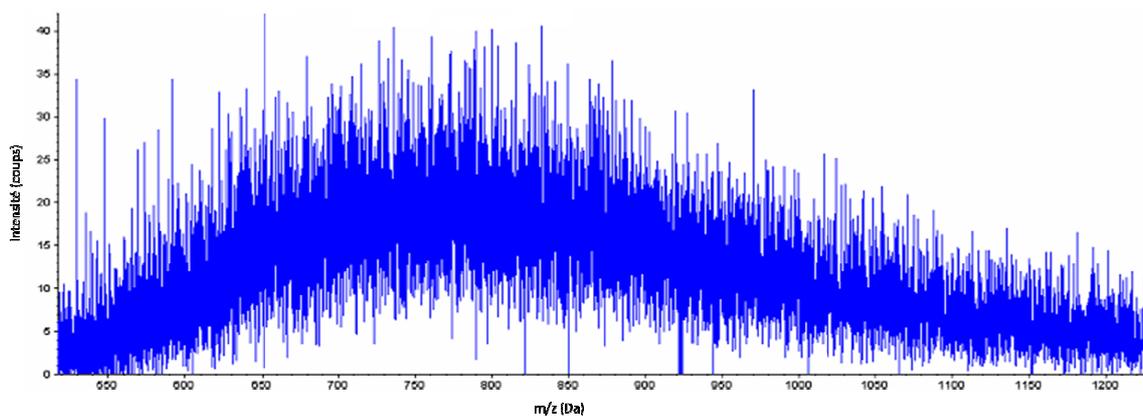
ANNEXE 1.



Annexe 1. Spectre de spectrométrie de masse et déconvolution du spectre du Fab₂

ANNEXE 2.

Annexe 2. Spectre de spectrométrie de masse et déconvolution du spectre du Fab'.

ANNEXE 3.

Annexe 3. Spectre de spectrométrie de masse (LCMS) du Fab'-S-S-PEG₈₀-b-PAEMA₁₈. La déconvolution du spectre ne peut être obtenue dû à l'hétérogénéité du produits et de la nature multichargée.

