



HAL
open science

Intérêts des ARN interférents comme outils thérapeutiques dans le traitement des cancers

Benoît Hamelin

► **To cite this version:**

Benoît Hamelin. Intérêts des ARN interférents comme outils thérapeutiques dans le traitement des cancers. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01566125

HAL Id: dumas-01566125

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01566125>

Submitted on 20 Jul 2017

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

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

UNIVERSITE DE CAEN NORMANDIE

ANNEE 2017

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PRESENTEE PAR

Benoît HAMELIN

SUJET : Intérêts des ARN interférents comme outils thérapeutiques
dans le traitement des cancers

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : 3 Juillet 2017

JURY :

Christophe DENOYELLE
Aurélie MALZERT-FRÉON
Pauline DELASALLE
Mathieu HAMELET

PRÉSIDENT DU JURY
EXAMINATEUR
EXAMINATEUR
EXAMINATEUR

REMERCIEMENTS

À Monsieur Christophe DENOYELLE

Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse et de présider ce jury. Votre disponibilité et vos conseils m'ont beaucoup touché et ont permis l'aboutissement de ce travail.

À Madame Aurélie MALZERT-FRÉON

Je suis honoré de l'intérêt que vous avez manifesté à participer au jury de cette thèse.

À Monsieur Mathieu HAMELET

Merci d'accepter de juger mon travail.

À Madame Pauline DELASALLE

Merci de participer au jury de cette thèse.

À Monsieur Pascal GAUDUCHON,

Je vous remercie de m'avoir accompagné au cours de l'élaboration du sujet et de m'avoir aiguillé vers Monsieur DENOYELLE lors de votre départ en retraite.

À Charlotte,

Tu as supporté mes errances et mes pertes de motivation pendant cette période. Merci pour tes encouragements et ta patience. J'apprécie chaque moment de notre vie et j'ai hâte que nos projets se concrétisent.

À mes parents, ma sœur et Bastien,

« Et ta thèse, ça avance ? » aura été la question la plus sensible de ces derniers mois. Je peux enfin vous dire qu'elle avance. Un grand merci de m'avoir permis de réaliser ces études et de votre soutien permanent.

À Marielle, Bernard et Alexandra,

Merci pour votre accueil chaleureux au sein de votre famille et pour l'aide que vous m'avez apportée.

À mes amis,

Alexandre, Benzouz, Céline, David, Edwige, Elodie, Emmanuelle, John Yes, JB, Justine, Marco, Meuh, Mireille, Pauline, Tony, merci pour tous ces bons moments et ces soirées inoubliables passés ensemble. Et pour tous ceux à venir. Merci à Edouard, Sophie et Thibault pour cette magnifique colocation pendant le stage à la Réunion. Enfin, un immense merci à McM et Goub' pour votre présence durant ces années d'études. Nos soirées CHU ou « au resto le moins cher de Caen » ont contribué à forger notre amitié. Il me tarde de vous retrouver sur COD ou BF ;)

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	6
1. L'ARN interférence	9
1.1. Historique	9
1.2. siRNA	12
1.2.1. Biosynthèse	13
1.2.1.1. Complexe DICER-TRBP	15
1.2.1.2. RNA-Induced Silencing Complex	17
1.2.2. Mécanisme d'action	19
1.3. miRNA.....	19
1.3.1. Biosynthèse des miRNA	21
1.3.1.1. Phase nucléaire	23
1.3.1.2. Phase cytoplasmique	27
1.3.2. Mécanisme d'action	28
1.4. piRNA.....	31
2. Intérêts et limites de l'utilisation de siRNA en oncologie	33
2.1. Choix de la molécule d'ARN interférence	34
2.2. Choix de la cible	36
2.2.1. Cycle cellulaire	37
2.2.2. Prolifération cellulaire	37
2.2.3. Mort cellulaire.....	37
2.2.4. Angiogénèse.....	38
2.2.5. Résistance aux chimiothérapies	38
2.3. Choix de la séquence du siRNA ⁽⁴⁴⁾	39
2.4. Choix de la voie d'administration	43
2.5. Challenges de l'utilisation de siRNA <i>in vivo</i>	44
2.5.1. Stabilité et clairance plasmatique.....	44
2.5.2. Internalisation cellulaire et échappement endosomal	45
2.5.3. Réponse immunitaire	45
2.5.3.1. Réponse dépendante des TLR	46
2.5.3.1.1. TLR 3	46
2.5.3.1.2. TLR 7 et 8.....	46
2.5.3.2. Réponse indépendante des TLR.....	47
2.5.3.3. Effets bénéfiques de la réponse immunitaire	48
2.5.4. Effets hors cibles (« <i>off target</i> »)	50
2.5.4.1. Voie miRNA-like	50
2.5.4.2. Voie médiée par le brin passager	50
2.5.5. Saturation de la machinerie d'ARN interférence.....	51
3. Solutions pour améliorer la délivrance systémique des siRNA	52
3.1. Modifications chimiques du siRNA	52
3.2. Conjugaison au siRNA	56
3.2.1. Conjugaison à des lipides.....	56
3.2.2. Conjugaison à des saccharides.....	57
3.2.3. Conjugaison à des peptides de pénétration cellulaire	58
3.3. Vectorisation des siRNA	58

3.3.1. Définition	60
3.3.2. Evolution des nanovecteurs	60
3.3.2.1. Nanovecteurs de première génération	60
3.3.2.2. Nanovecteurs de deuxième génération.....	61
3.3.2.3. Nanovecteurs de troisième génération	62
3.3.3. Propriétés physico-chimiques des nanovecteurs de siRNA.....	63
3.3.3.1. Influence de la taille des nanovecteurs.....	63
3.3.3.2. Influence de la charge de surface	64
3.3.4. Nanovecteurs de siRNA : avantages et inconvénients.....	65
3.3.4.1. Polyplexes	66
3.3.4.1.1. Poly (éthylène imine)	66
3.3.4.1.2. Dendrimères	68
3.3.4.1.3. Chitosane	69
3.3.4.1.4. Cyclodextrines (CD).....	70
3.3.4.1.5. Atélocollagène.....	71
3.3.4.2. Lipoplexes et nanoparticules lipidiques	72
3.3.4.3. Nanoparticules métalliques	76
3.3.4.3.1. Nanoparticules magnétiques (MNP)	77
3.3.4.3.2. Nanoparticules d'or (AuNP)	81
3.3.4.4. Les nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN)	82
3.3.4.5. Nanotubes de carbone (CNT) et oxydes de graphène (GO).....	84
3.3.4.6. Quantum Dots (QDs)	85
3.4. Ciblage tumoral	86
3.4.1. Ciblage passif.....	86
3.4.2. Ciblage actif.....	87
3.4.2.1. Acide folique	88
3.4.2.2. Transferrine	90
3.4.2.3. Anticorps et aptamères	91
3.4.2.4. Petits peptides.....	91
4. Essais cliniques	94
4.1. CALAA-01	95
4.2. Atu027	97
4.3. TKM-PLK1 (ou TKM-080301).....	100
4.4. ALN-VSP	102
5. Discussion.....	105
5.1. Sélection de la cible.....	105
5.2. Sélection des patients.....	107
5.3. Délivrance intratumorale	107
5.4. Ciblage tumoral	110
5.5. Voie d'administration	111
5.6. Co-administration	112
Conclusion.....	114
INDEX DES TABLEAUX.....	115
INDEX DES FIGURES	116
BIBLIOGRAPHIE	118

INTRODUCTION

Selon une étude anglaise publiée en Août 2016, les cancers sont devenus la première cause de mortalité chez l'homme en France et la deuxième cause de mortalité chez la femme après les maladies cardiovasculaires⁽¹⁾. Cette maladie conduit à 150000 décès en moyenne chaque année⁽²⁾. Les chimiothérapies actuelles, bien qu'efficaces, manquent de spécificité, entraînant des effets indésirables marqués. Suite à ces traitements, le développement de chimiorésistances est également fréquemment observé. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour cibler au mieux les tumeurs et augmenter l'efficacité des traitements.

L'ARN interférence est un mécanisme d'extinction génique post-transcriptionnelle médié par de petits ARN non codants. Depuis sa découverte par Fire et Mello en 1998⁽³⁾, elle constitue une voie majeure de développement pour la recherche médicale, en particulier en oncologie. En effet, la compréhension des mécanismes liés à cette voie a permis d'entrevoir un potentiel pour restaurer ou inhiber des fonctions dérégulées dans les cellules tumorales.

Il semble clair que l'ARN interférence offre toute une série d'outils présentant un intérêt majeur en clinique. Cependant, les « *small interfering RNA* » (siRNA) et les « *micro RNA* » (miRNA), lorsqu'ils sont administrés nus sont sujets à une dégradation rapide par les nucléases naturellement présentes dans le sérum⁽⁴⁾.

De plus, la molécule de siRNA est trop grosse (13kDa) et trop chargée négativement pour traverser les membranes cellulaires de la plupart des types cellulaires sans aide extérieure⁽⁵⁾. Ainsi, pour que le siRNA puisse atteindre le compartiment cytoplasmique des

cellules ciblées, il aura besoin d'être à la fois protégé contre la dégradation mais aussi d'être transporté à travers les membranes. Il sera également souvent intéressant de pouvoir amener les siRNA et/ou augmenter leurs capacités d'internalisation plus spécifiquement au niveau du tissu cible, par exemple dans la tumeur ou dans le tissu qui est le siège de l'affection qui doit être traitée. Par ailleurs, la complexité et la diversité des mécanismes d'ARN interférence et la nature même de ces molécules d'ARN font que de nombreux effets connexes peuvent survenir en réponse à l'administration de petits ARN non codants, tels qu'une immunostimulation non spécifique ou l'apparition d'effets dits « off-target »⁽⁶⁾. La vectorisation et le ciblage auront également pour objectif de supprimer ou de réduire l'étendue de ces effets indésirables.

Parallèlement à l'étude des mécanismes et applications thérapeutiques de l'ARN interférence, se sont développées ces vingt dernières années les nanotechnologies. Celles-ci sont dotées de part leur taille de propriétés nouvelles qui intéressent de nombreux domaines y compris le domaine de la santé où elles peuvent participer au diagnostic et au traitement de pathologies en agissant de manière directe ou indirecte.

Dans un premier temps, je décrirai les grandes étapes ayant conduit aux connaissances actuelles concernant l'ARN interférence puis les rôles, les mécanismes mis en jeu et les différentes voies impliquées dans ce phénomène.

La deuxième partie traitera des avantages liés à l'utilisation de l'ARN interférence et les paramètres importants lors de la conception de molécules à visée thérapeutique, à savoir le choix de la cible, de la séquence et de la voie d'administration. Je développerai également dans cette partie les limites liées à l'administration systémique de siRNA.

La troisième partie détaillera les solutions mises en œuvre pour améliorer la pharmacocinétique et la biodistribution des petits ARN. L'apport de la modification chimique des siRNA, la conjugaison de molécules et l'incorporation dans des nanovecteurs seront abordés ainsi que les possibilités de cibler préférentiellement les tumeurs.

Ces dernières années ont vu émerger les premiers essais cliniques basés sur l'administration de siRNA chez l'Homme. La quatrième partie exposera les résultats issus de ces études de Phase I.

1. L'ARN interférence

La découverte de l'ARN interférence a révolutionné le domaine de la régulation des gènes en révélant une voie commune à la plupart des cellules eucaryotes.

L'ARN interférence est un mécanisme cellulaire dépendant de l'ARN reposant sur la complémentarité de séquence entre de petits ARN non codants et leurs ARNm cibles. Elle conduit à une inhibition de l'expression génique post-transcriptionnelle avec une grande spécificité de séquence.

Chez l'Homme, 70% du génome est transcrit, notamment en ARN non codants responsables de la régulation de plus de 60% des gènes⁽⁷⁾. Trois grandes voies sont mises en œuvre dans l'ARN interférence : les « *short interfering RNA* » (siRNA), les « *micro RNA* » (miRNA) et les « *piwi interacting RNA* » (piRNA). L'ARN interférence joue un rôle dans la plupart des processus du développement, de la prolifération cellulaire et de la régulation du métabolisme. Elle est également impliquée dans la lutte contre les infections virales et les transposons⁽⁸⁾.

1.1. Historique

La première observation du phénomène d'ARN interférence, bien que non identifiée, a été décrite en 1990 par l'équipe de Jorgensen et Napoli⁽⁹⁾. Ces chercheurs ont introduit dans des pétunias des copies du gène *chs* codant pour la chalcone synthétase, une enzyme impliquée dans la production de flavonoïdes responsables de la coloration pourpre de la fleur. Cette expérience avait pour but d'augmenter la coloration violette des fleurs de pétunias. De manière surprenante, certaines plantes (42%) issues de pétunias modifiés par

l'introduction de ces copies de gènes ont exprimé soit des fleurs présentant des tâches blanches soit des fleurs totalement blanches (Figure 1). Ces résultats ont montré non seulement que le transgène ne s'était pas exprimé mais aussi qu'il y avait une inhibition de l'expression du gène endogène. Ce phénomène d'inhibition, héritable et réversible après plusieurs floraisons, fut nommé « co-suppression ».

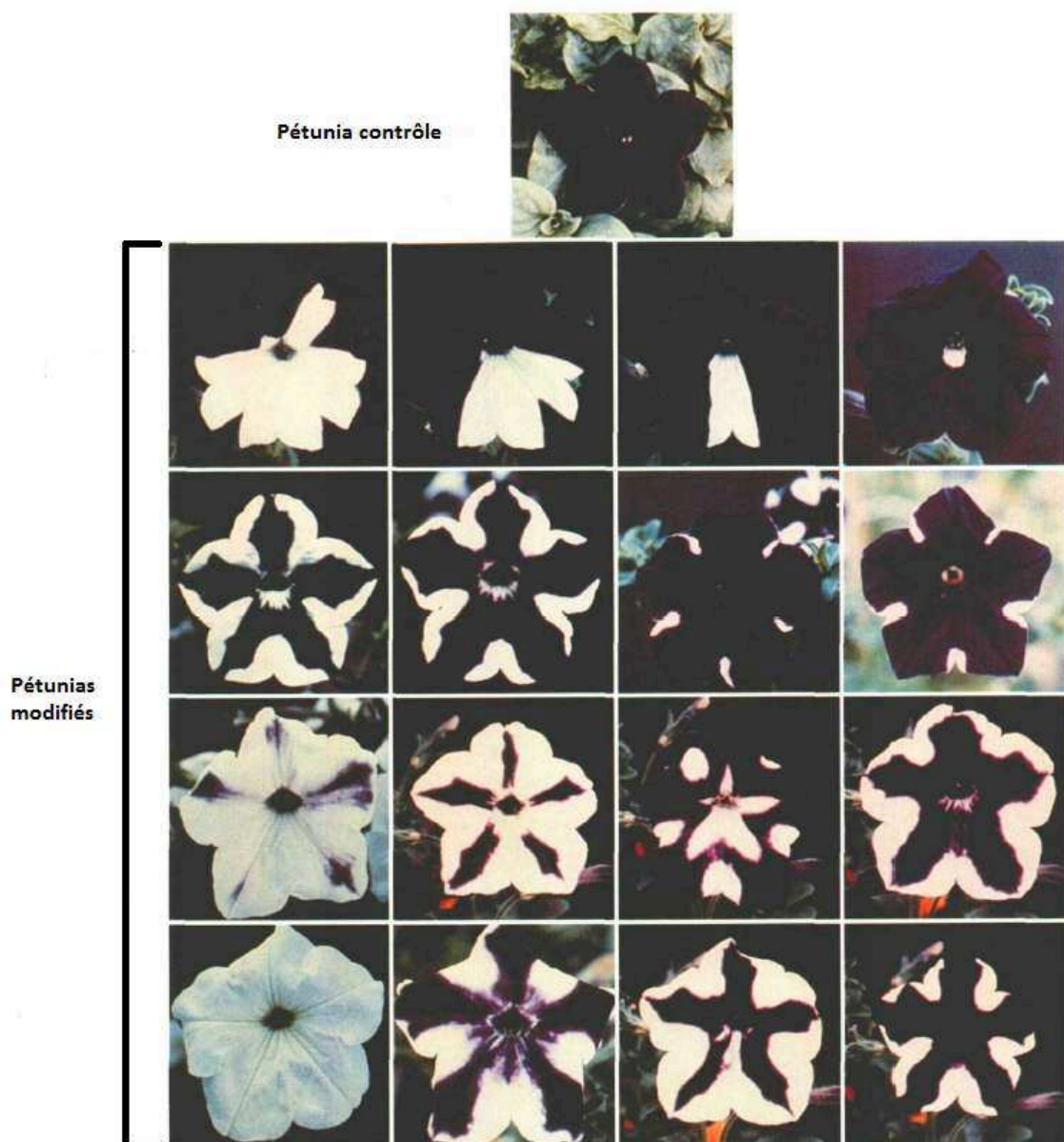


Figure 1 : Phénotypes des fleurs de pétunias modifiées par le transgène *chs*⁽⁹⁾

En 1992, l'équipe de Romano et Macino est parvenue à des résultats similaires après transgénèse de copies du gène *alb-1* impliqué dans la biosynthèse de caroténoïdes responsables de la couleur orange chez le champignon *Neurospora crassa*. Après transgénèse, 36% des colonies sont apparues blanches avec une diminution de l'ARNm correspondant. Ces résultats chez le champignon, similaires à ceux décrits chez le pétunia, ont été définis par le terme « quelling »⁽¹⁰⁾, que l'on peut traduire par « répression ».

En 1998, Fire et Mello ont comparé chez le ver *Caenorhabditis elegans* les effets de l'injection d'ARN simple brin sens, antisens et d'ARN double brin correspondant à deux exons du gène *unc-22*, codant pour une protéine du myofilament non essentielle⁽³⁾. L'injection d'ARN simple brin sens ou antisens, même à forte dose, a entraîné une faible inhibition du gène *unc-22*, tandis qu'une faible dose (quelques molécules par cellule) d'ARN double brin a conduit à une inhibition marquée de ce gène. Fire et Mello ont également constaté que l'inhibition observée par injection d'ARN double brin était spécifique du gène homologue et n'était pas retrouvée par ciblage d'introns ou de promoteurs. Ils nommèrent ce phénomène d'extinction génique post-transcriptionnelle médié par un ARN double brin, ARN interférence.

Chez les mammifères, l'injection de longs ARN double brin conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons ce qui a longtemps empêché l'observation de l'ARN interférence. La découverte de petits ARN de 25 nucléotides chez les plantes associés à l'ARN interférence par Hamilton et Baulcombe en 1999⁽¹¹⁾, puis la caractérisation des « *small interfering RNA* » (siRNA) par Tuschl en 2001⁽¹²⁾, ont permis à l'équipe de Tuschl et Elbashir de démontrer la survenue de l'ARN interférence chez des cellules de mammifères en culture par injection de petits ARN homologues d'ARNm sans

déclencher de réponse inflammatoire⁽¹³⁾. Cette découverte a mis en lumière une utilisation possible de ce mécanisme comme nouvelle stratégie thérapeutique chez l'Homme.

1.2. siRNA

Les « *small interfering RNA* » (siRNA) sont de petits ARN double brin pouvant provenir de précurseurs endogènes (« endosiRNA ») ou exogènes. Les siRNA endogènes ont été mis en évidence chez *Caenorhabditis elegans* et les plantes comme le résultat de l'action catalytique d'ARN polymérase ARN dépendante capables de synthétiser de longs ARN double brin au sein du noyau ensuite exportés vers le cytoplasme pour être pris en charge par la ribonucléase DICER. Leur rôle a d'abord été observé chez les plantes comme réponse à un stress ou comme mécanisme de défense contre les virus.

Chez les mammifères, l'absence d'ARN polymérase ARN dépendante semblait écarter l'hypothèse de la présence d'endosiRNA jusqu'à la découverte de séquences d'ADN endogènes répétées dispersées, les rétrotransposons. Ces derniers sont capables de synthétiser un ARN bidirectionnel en utilisant un promoteur dans les orientations sens et antisens. Les endosiRNA sont issus majoritairement de régions comportant des répétitions inversées en tandem permettant la formation de structures intramoléculaires au sein des longs ARN double brin formés. Leur rôle est encore mal connu mais ils pourraient lutter contre les infections virales et être impliqués dans la défense contre les transposons⁽¹⁴⁾.

Les précurseurs de siRNA peuvent également être d'origine exogène, synthétisés par des ARN polymérases ARN dépendantes suite à une infection virale ou à une introduction expérimentale ou thérapeutique.

1.2.1. Biosynthèse

Les longs ARN double brin précurseurs de siRNA, dont les deux brins sont appariés de manière parfaitement complémentaire, sont retrouvés dans le cytoplasme. Ils sont incorporés dans le complexe ribonucléase DICER-TRBP et clivés en petits ARN double brin de 19 à 22 nucléotides, ayant une extrémité 3'hydroxylée avec deux nucléotides non appariés et une extrémité 5 phosphorylée, les « *small interfering RNA* ». Ensuite, ces siRNA vont être intégrés au « *RNA-Induced Silencing Complex* » (RISC) pour interagir avec l'ARNm cible (Figure 2)⁽¹⁵⁾.

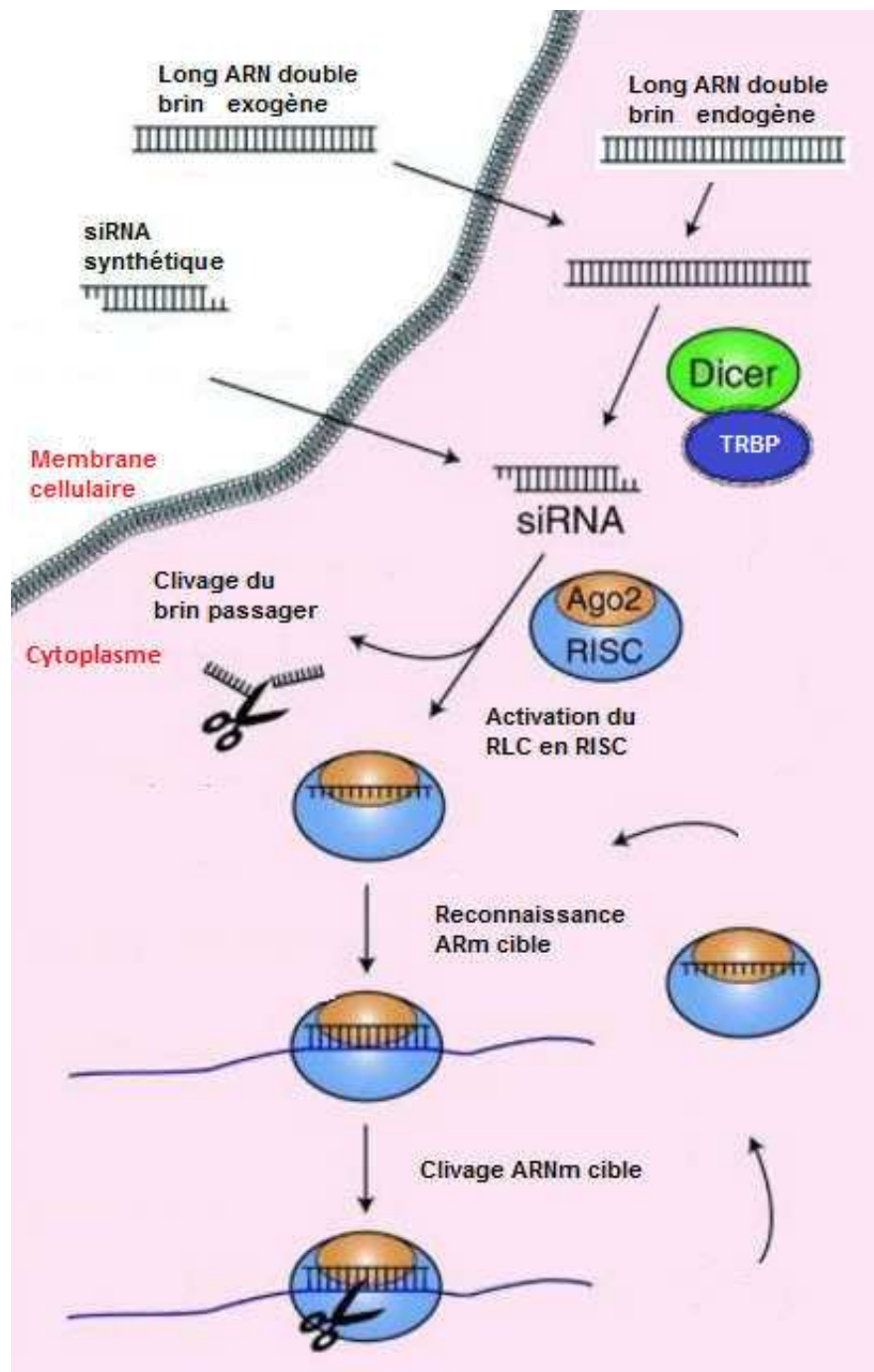


Figure 2 : voie des siRNA

1.2.1.1. Complexe DICER-TRBP

DICER (Figure 3) est une ribonucléase III de classe 3 magnésium-dépendante très conservée au cours de l'évolution puisqu'elle est retrouvée chez tous les eucaryotes. Chez l'Homme, DICER se compose⁽¹⁵⁾ :

- d'un domaine nommé PIWI Argonaute Zwiille (PAZ) car commun à ces 3 familles de protéines,
- de deux domaines catalytiques ribonucléase IIIa et IIIb organisés en tandem (RNase III),
- de deux domaines hélicase/ATPase dans la région N-terminale (hélicase),
- de deux domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRNA).

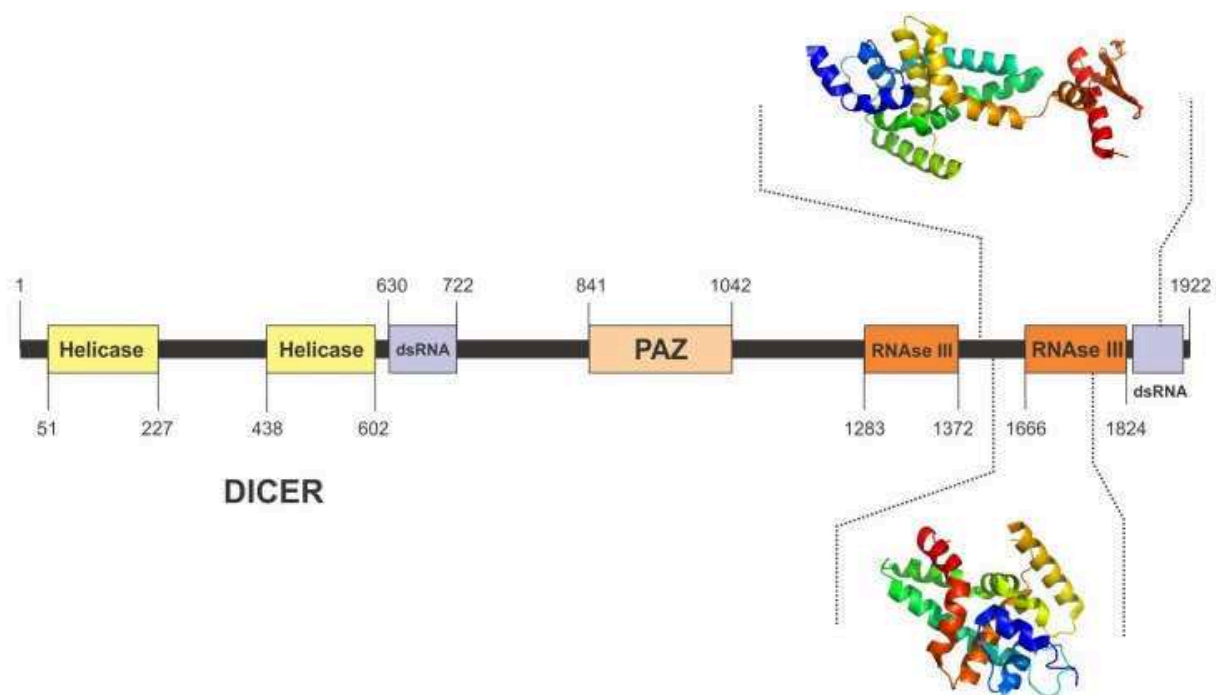


Figure 3 : Structure de DICER⁽¹⁵⁾

TRBP (Trans-activation response RNA Binding Protein, Figure 4) est une protéine de liaison à l'ARN double brin se composant⁽¹⁶⁾ :

- de deux domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD1 et dsRBD2) dans la région N-terminale,
- d'un domaine se fixant au domaine hélicase/ATPase de DICER dans la région C-terminale.

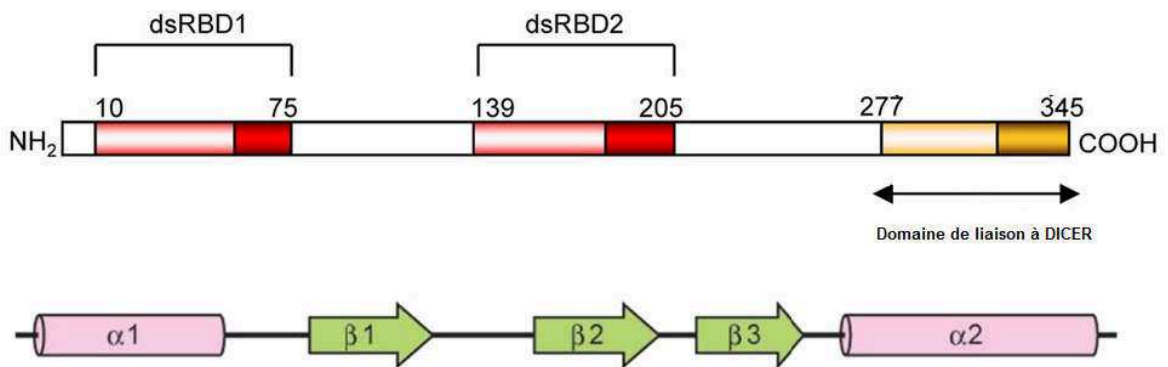


Figure 4 : Structure de TRBP⁽¹⁷⁾

Les fonctions de TRBP ne sont pas encore totalement élucidées mais il semblerait que cette protéine soit impliquée dans la reconnaissance et la fixation spécifique des précurseurs de siRNA et miRNA pour assurer leur prise en charge par DICER. De plus, TRBP pourrait jouer un rôle dans la sélection du brin guide par la protéine Argonaute⁽¹⁷⁾.

Les deux domaines catalytiques ribonucléases IIIa et IIIb de DICER abritent deux sites actifs et une poche chargée positivement par la présence de résidus Lysine permettant d'accueillir une longue chaîne d'ARN double brin. De plus, chaque site actif porte quatre résidus acides (Glutamate ou Aspartate) coordonnant deux ions Mg^{2+} impliqués dans

l'hydrolyse des liaisons phosphodiester de chaque brin du précurseur de siRNA⁽¹⁸⁾. Les deux domaines ribonucléases III situés en vis-à-vis avec un décalage clivent les précurseurs de siRNA en siRNA double brin d'environ 21 nucléotides ayant deux nucléotides non appariés à l'extrémité 3' (Figure 5).

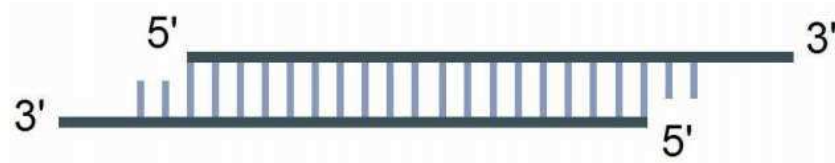


Figure 5 : Structure d'un siRNA⁽¹³⁾

Les siRNA restent associés au complexe DICER-TRBP et vont interagir avec une protéine Argonaute *via* la protéine TRBP. Le complexe ainsi formé, le « *RNA Loading Complex* » (RLC), est inactif et nécessite la dissociation des deux brins du siRNA. Le brin dont la stabilité thermodynamique est la plus faible au niveau de l'extrémité 5', le brin guide, est conservé par le RLC tandis que l'autre brin, le brin passager, est dégradé. Le brin guide chargé sur la protéine Argonaute active le RLC en « *RNA-Induced Silencing Complex* » (RISC) capable d'interagir avec un ARNm complémentaire.

1.2.1.2. RNA-Induced Silencing Complex

Le RISC se forme dans un premier temps par recrutement d'une protéine Argonaute par le complexe DICER-TRBP⁽¹⁶⁾. Les protéines Argonaute appartiennent à une grande famille de protéines de liaison à l'ARN (Figure 6).

Elles se composent⁽¹⁵⁾ :

- d'un domaine PAZ se liant à DICER et à l'extrémité 3' du brin guide du siRNA,
- d'un domaine MID se liant à l'extrémité 5' du brin guide du siRNA par interaction non spécifique entre le groupement phosphate terminal et deux résidus Lysine et par interaction spécifique entre une boucle rigide du domaine MID et une Adénosine ou une Uridine du brin guide,
- d'un domaine PIWI liant DICER *via* une « PIWI box » et guidant le siRNA vers l'ARN cible,
- d'un domaine hélicase permettant de dérouler et séparer les deux brins du siRNA afin de ne conserver que le brin guide au sein du RISC.

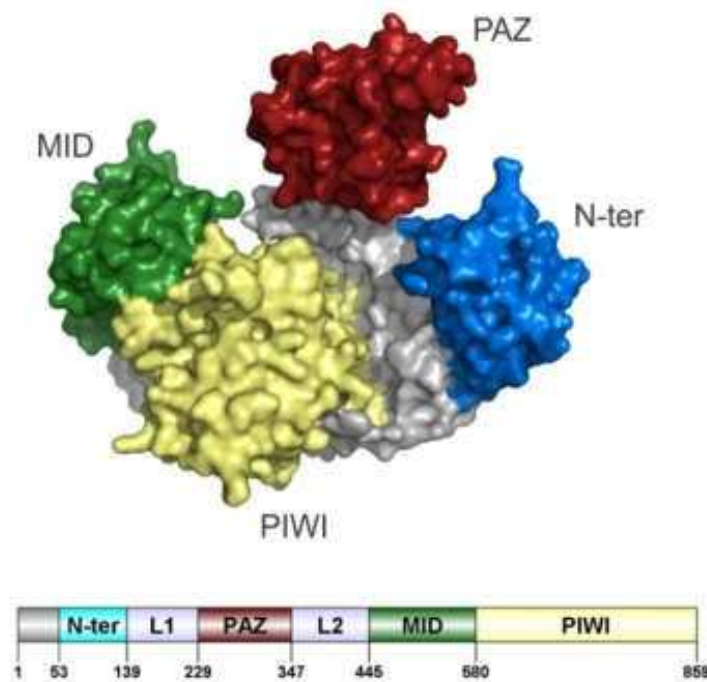


Figure 6 : Structure des protéines Ago chez l'Homme. Les domaines N-ter, MID et PIWI forment une cavité partiellement remplie par le domaine PAZ(15)

Chez l'Homme, il existe quatre protéines Argonaute (Ago1, Ago2, Ago3 et Ago4) impliquées dans l'ARN interférence, mais seule Ago2 possède une activité ribonucléase RNase-like au sein du domaine PIWI. Cette activité, médiée par deux atomes de magnésium reliés à trois résidus Aspartate, confère au RISC la capacité de cliver l'ARNm cible d'un siRNA⁽¹⁹⁾.

1.2.2. Mécanisme d'action

Dans la voie des siRNA, la complémentarité de séquence entre le siRNA et son ARNm cible est parfaite. Suite à la reconnaissance et à la fixation du siRNA sur sa cible, Ago2 clive l'ARNm entre le 10^e et le 11^e nucléotide par rapport à l'extrémité 5'⁽¹⁹⁾. L'ARNm clivé est ensuite dégradé par des endo et exonucléases cytoplasmiques non spécifiques. Le siRNA est quant à lui protégé de cette dégradation par le RISC et peut être réutilisé pour fixer et inhiber d'autres ARNm cibles.

1.3. miRNA

Les miRNA sont une classe abondante de petits ARN contrôlant l'expression génique. Ils ont été caractérisés par Lee et Ambros en 1993 lors de l'étude du gène *lin-14*, impliqué dans le développement larvaire de *Caenorhabditis elegans*⁽²⁰⁾. Ces chercheurs ont découvert deux petits ARN de 22 et 61 nucléotides issus du gène *lin-4*, possédant une complémentarité imparfaite avec des séquences répétées de la région 3'UTR de l'ARNm de *lin-14*. Ces petits ARN, ne codant pas pour des protéines, exercent un contrôle négatif sur la production de la protéine LIN-14 et favorisent le passage au stade larvaire L1 à L2.

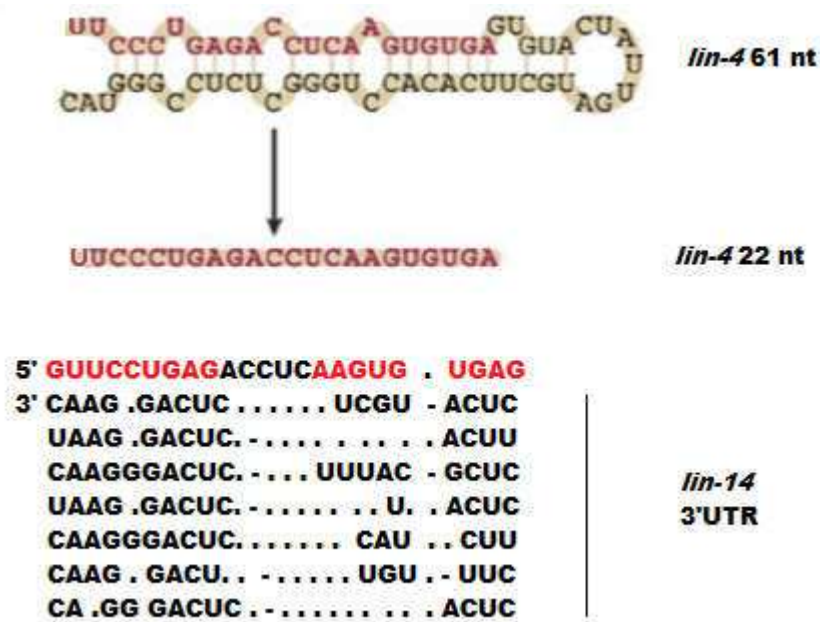


Figure 7 : ARN de *lin-4* et complémentarité avec l'ARNm de *lin-14*⁽²⁰⁾

En 2000, Pasquinelli a démontré la conservation de ces petits ARN au cours de l'évolution en découvrant un miRNA, *let-7*, présent chez tous les eucaryotes testés⁽²¹⁾.

A ce jour, 2588 miRNA matures ont déjà été identifiés chez l'Homme comme régulateurs de la majorité des processus biologiques fondamentaux : croissance, prolifération, apoptose et différenciation cellulaire, régulation du métabolisme et chronologie du développement (Tableau 1)⁽²²⁾.

Les miRNA agissent en réseaux où un miRNA peut cibler en même temps une centaine d'ARNm différents et plusieurs miRNA peuvent avoir la même cible. Cette redondance rend difficile la prédiction du rôle exact de chaque miRNA.

Tableau 1 : Exemples de miRNA impliqués dans la différenciation cellulaire

miRNA	Rôle
miR-124, miR-134 ⁽²³⁾	Développement des cellules neuronales
miR-1, miR-133a, miR-499 ⁽²⁴⁾	Développement des cellules cardiaques
miR-206, miR-208a/b ⁽²³⁾	Développement des muscles squelettiques
miR-128, miR-181 ⁽²⁵⁾	Développement des cellules hématopoïétiques
miR-200, miR-302, miR-367 ⁽²³⁾	Développement embryonnaire

1.3.1. Biosynthèse des miRNA

La biosynthèse des miRNA peut être séparée en deux étapes. La première étape de maturation se déroule dans le noyau. Ensuite, les précurseurs sont acheminés dans le cytoplasme où ils vont suivre une deuxième étape de maturation avant de pouvoir interagir avec leur cible (Figure 8).

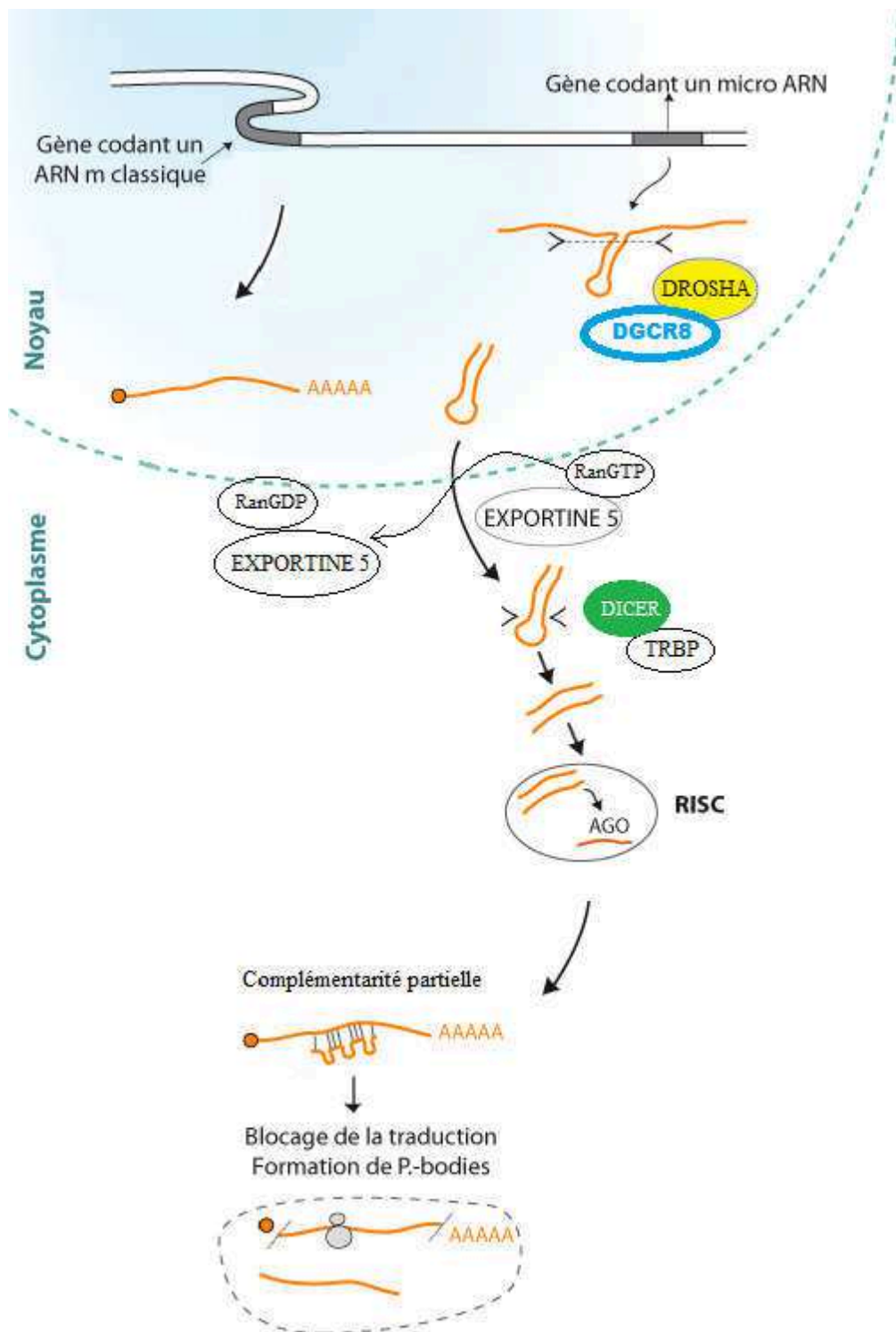


Figure 8 : Voie d'extinction post-transcriptionnelle médiée par les miRNA⁽²⁶⁾

1.3.1.1. Phase nucléaire

La voie « classique » de biosynthèse des miRNA débute par la transcription du gène par une ARN polymérase II. Les miRNA proviennent de la transcription de gènes localisés sur l'ensemble des chromosomes, soit au niveau d'introns, soit au niveau d'unités transcriptionnelles codantes ou non. Chez l'Homme, 50% des gènes codants pour des miRNA sont regroupés en cluster sous la forme de précurseurs polycistroniques possédant un même promoteur (Figure 9)⁽⁸⁾⁽²⁷⁾.

La transcription conduit à la formation d'un « *primary-micro RNA* » (pri-miRNA) de taille supérieure à 1000 nucléotides. Ces pri-miRNA sont formés d'un ARN simple brin se repliant sur lui-même pour former localement des « épingles à cheveux » d'environ 80 nucléotides par complémentarité imparfaite de séquences. De plus, ils possèdent une queue polyadénylée à l'extrémité 3' et une coiffe 7-méthylguanosine à l'extrémité 5'.

Les motifs en épingles à cheveux sont ensuite reconnus et libérés par le complexe protéique DROSHA-DGCR8, nommé le « microprocesseur ». Celui-ci est composé d'une ribonucléase de type III, DROSHA, et de deux protéines de liaison à l'ARN double brin, DGCR8⁽¹⁶⁾. Le clivage des motifs en épingles à cheveux par ce complexe trimérique conduit à la formation des « *precursor microRNA* » (pre-miRNA) composés d'environ 70 à 80 nucléotides ayant une structure tige-boucle. La tige des pre-miRNA se termine par deux nucléotides non appariés en 3' dont le dernier est hydroxylé et une extrémité 5' phosphorylée.

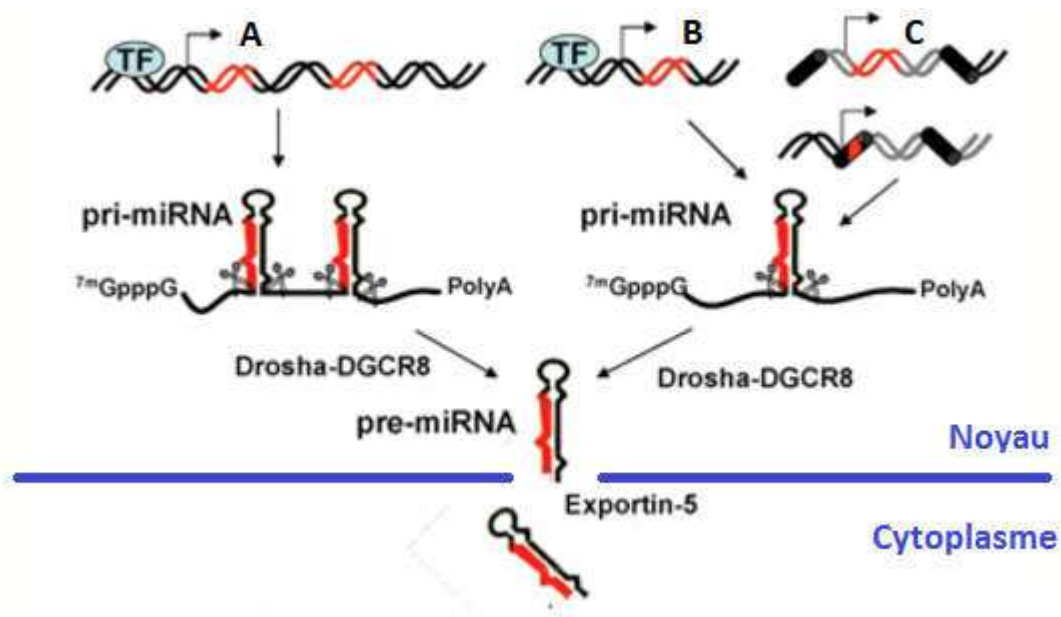


Figure 9 : phase nucléaire de la biosynthèse de miRNA (A) transcription de précurseurs polycistroniques, (B) régions intergéniques, (C) transcription au niveau d'introns (en gris) ou d'exons (en noir). TF : facteur de transcription⁽²⁸⁾

Le microprocesseur DROSHA-DGCR8

La maturation des pri-miRNA en pre-miRNA au sein du noyau fait intervenir un complexe hétérotrimérique composé d'une endonucléase magnésium-dépendante, DROSHA, et de deux protéines de liaison à l'ARN, DGCR8.

DROSHA (Figure 10) est une ribonucléase de type III composée de deux régions⁽¹⁵⁾ :

- une région N-terminale flexible impliquée dans les interactions avec DGCR8,
- une région C-terminale comportant deux domaines catalytiques caractéristiques des ribonucléases de type III, organisés en dimères et un domaine de liaison à l'ARN double brin.

DGCR8 (*DiGeorge Critical Region 8*, Figure 10) est une protéine de liaison à l'ARN double brin. Elle se nomme ainsi car elle est transcrite à partir d'un gène sur le chromosome 22 appartenant à un locus dont la délétion entraîne le syndrome de DiGeorge. Elle se compose de deux régions⁽¹⁵⁾ :

- une région N-terminale comportant un domaine Tryptophane-Tryptophane (WW) et un domaine de liaison de l'hème permettant la dimérisation de DGCR8,
- une région C-terminale comportant deux domaines de liaison à l'ARN double brin et une queue C-terminale permettant les interactions avec DROSHA.

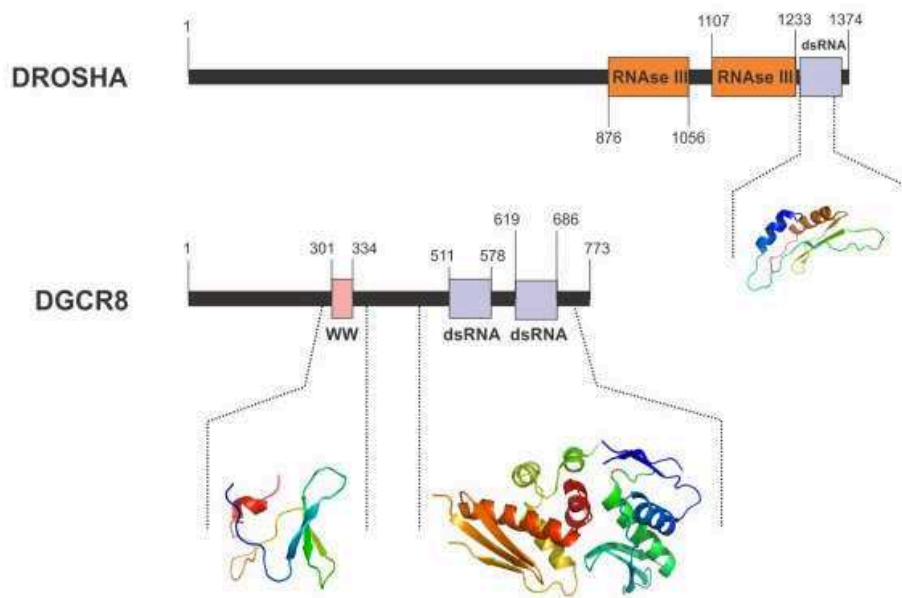


Figure 10 : Structure de DROSHA et DGCR8 chez l'Homme⁽¹⁵⁾

DGCR8 reconnaît les motifs en épingles à cheveux des pri-miRNA, en particulier un enchaînement Uridine-Guanosine-Uridine (U-G-U) présent au niveau de la boucle apicale de ces motifs. Ensuite, les deux domaines de liaison à l'ARN double brin se lient à la tige tandis que la queue C-terminale stabilise DROSHA (Figure 11)⁽¹⁶⁾.

DROSHA se positionne au niveau d'un motif Uridine-Guanosine (U-G) présent à la jonction entre la tige des épingles à cheveux et la partie latérale simple brin et clive les extrémités 3' et 5' au niveau du 11^e nucléotide en aval de la base de la tige pour libérer les motifs tige-boucle formant les pre-miRNA. Le clivage par DROSHA entraîne l'apparition de deux nucléotides non appariés à l'extrémité 3', dont le dernier est hydroxylé, et une extrémité 5' phosphorylée, signatures spécifiques de l'action des ribonucléases de type III.

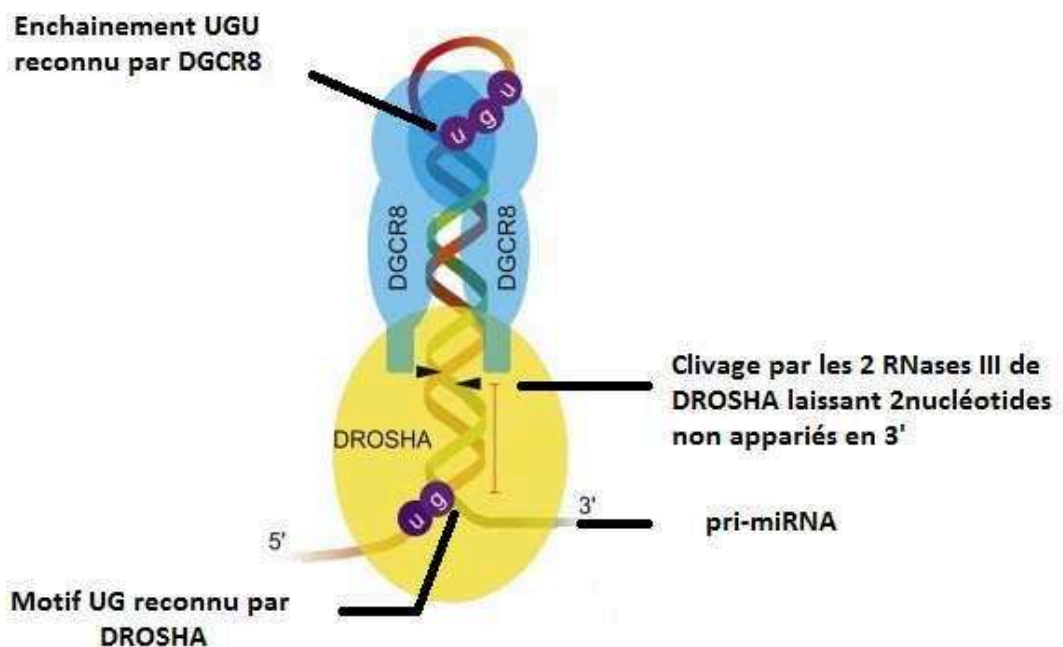


Figure 11: fixation du microprocesseur nucléaire sur le pri-miRNA⁽²⁹⁾

Les pre-miRNA obtenus vont être exportés du noyau vers le cytoplasme *via* des pores nucléaires après association à une protéine de liaison à l'ARN, l'Exportine 5. Cette protéine peut lier jusqu'à trois pre-miRNA dans le noyau et les transporter vers le cytoplasme de façon active grâce à un site de fixation au co-facteur Ran-GTP. Après liaison du Ran-GTP, l'Exportine 5 reconnaît les deux nucléotides non appariés en 3' du

pre-miRNA et les fixe par interactions ioniques spécifiques dans une poche étroite. Ce blocage des nucléotides terminaux assure une protection accrue contre la dégradation des pre-miRNA par des ribonucléases durant le transport. Une fois le complexe trimérique Exportine 5/Ran-GTP/pre-miRNA acheminé dans le cytoplasme, le pre-miRNA est libéré par hydrolyse du GTP en GDP.

1.3.1.2. Phase cytoplasmique

La phase cytoplasmique de biosynthèse des miRNA fait intervenir dans un premier temps le complexe DICER-TRBP, de la même manière que dans la voie de biosynthèse des siRNA. Le domaine PAZ de DICER reconnaît l'extrémité 3' hydroxylée et l'extrémité 5' phosphorylée des pre-miRNA tandis que le domaine hélicase/ATPase reconnaît la boucle apicale et sert de pince pour l'action des domaines ribonucléases IIIa et IIIb. La longueur des muRNA est conditionnée par la distance entre le domaine PAZ et les domaines ribonucléases IIIa et IIIb. DICER agit donc comme une « règle moléculaire ».

Les miRNA obtenus sont des ARN double brin de 19 à 22 nucléotides possédant à l'extrémité 3' deux nucléotides non appariés, dont le dernier est hydroxylé et une extrémité 5' phosphorylée.

Le duplex d'ARN reste couplé au complexe DICER-TRBP et s'associe avec une des quatre protéines Argonaute pour former le miRISC. L'élimination du brin passager au profit du brin guide permet la formation du miRISC activé.

1.3.2. Mécanisme d'action

Lorsque le brin guide du miRNA est chargé sur le miRISC, il peut cibler aussi bien les régions 3' et 5'UTR que les régions ORF des ARNm régulés. Contrairement aux siRNA, les miRNA s'apparient de manière imparfaite avec l'ARNm cible. Néanmoins, la complémentarité entre la région située entre le 2^e et le 8^e nucléotide sur le miRNA (« *seed sequence* ») et la séquence correspondante sur l'ARNm est primordiale pour obtenir une répression de la traduction et la dégradation de l'ARNm. Les mécanismes de l'interaction du miRISC avec l'ARNm cible ne sont pas encore élucidés, mais il semblerait que l'activité ribonucléase d'Ago2 ne soit pas enclenchée, ce qui expliquerait que les quatre protéines Ago puissent intervenir dans la voie des miRNA.

Le mécanisme d'inhibition de la traduction pourrait passer par le recrutement d'une protéine de la famille GW 182, nommée TNRC6C, qui possède de nombreuses répétitions de Glycine (G) et Tryptophane (W) au sein d'un domaine Argonaute Hook Domain dans sa région N-terminale (Figure 12). Ce domaine se lie au domaine PIWI de la protéine Argonaute du miRISC et l'ensemble migre vers les « *P-bodies* », une région du cytoplasme impliquée dans le turn-over des ARNm. TNRC6C recrute ensuite la protéine « *PolyAdenylate Binding Protein* » (PABP) qui se fixe à la queue polyadénylée de l'ARNm ciblé par le miRNA. Cette interaction TNRC6C-PABP-ARNm empêche la fixation du complexe d'initiation de la traduction eIF4G, inhibant ainsi la traduction de l'ARNm cible. Enfin, la protéine Argonaute liée à TNRC6C s'associe au complexe déadénylase CCR4-NOT et à l'hélicase DEAD box DDX6 pour cliver la queue polyadénylée⁽¹⁶⁾ et à DCP2 pour retirer la coiffe de l'ARNm qui est ensuite dégradé par l'exoribonucléase XRN1⁽⁷⁾.

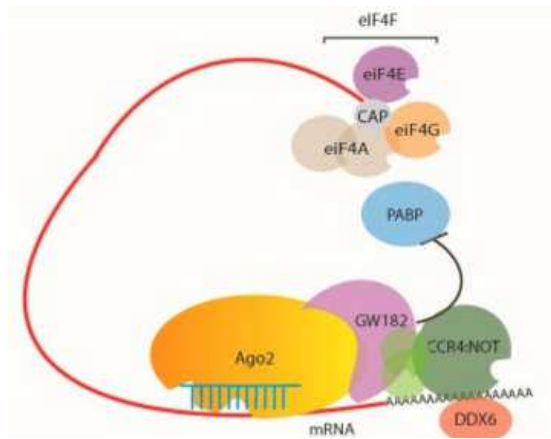


Figure 12 : Voie d'inhibition de la traduction protéine GW182-dépendante⁽¹⁶⁾

Une voie d'inhibition indépendante de la protéine GW182 a récemment été suggérée en bloquant directement la formation du complexe d'induction de la traduction eIF4F, par interaction entre le miRISC et la protéine eIF4A entraînant sa sortie du complexe eIF4F⁽¹⁶⁾ (Figure 13). Le blocage de l'initiation de la traduction pourrait aussi passer par l'inhibition du recrutement de la sous unité ribosomique 60S⁽³⁰⁾.

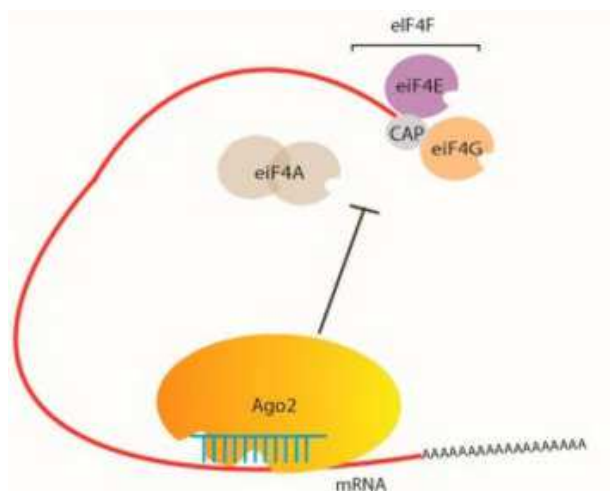


Figure 13 : Voie d'inhibition de la traduction protéine GW182-indépendante⁽¹⁶⁾

L'inhibition de la traduction de l'ARNm ciblé par les miRNA pourrait également intervenir par détachement des ribosomes pendant l'élongation ou par recrutement de protéases visant à dégrader les peptides naissants même si aucune enzyme n'a été détectée⁽³⁰⁾.

1.4. piRNA

Les « *piwi interacting RNA* » (piRNA) sont des ARN simple brin de 24 à 32 nucléotides, qui assurent le mécanisme d'ARN interférence majoritairement dans les cellules germinales afin de diminuer l'expression des transposons, des éléments génomiques mobiles pouvant causer des mutations délétères⁽¹⁵⁾.

Les précurseurs de piRNA, les pre-piRNA, sont issus de la transcription de gènes répartis dans tout le génome et comportant des fragments de séquences issus de transposons. Ils se présentent sous la forme de longs ARN simple brin de plusieurs milliers de nucléotides et sont exportés vers le cytoplasme où ils sont clivés par l'endonucléase Zucchini en piRNA primaires (Figure 14)⁽³¹⁾. Seuls les piRNA présentant une Uridine à l'extrémité 5' (1U piRNA) sont reconnus par PIWI, une protéine de la famille Argonaute, associée à AUB (Aubergine), une protéine de liaison à l'ARN, et chargés au sein du « *piwi interacting RNA Complex* » (piRC). Les 1U piRNA subissent ensuite une méthylation de leur extrémité 3' par la protéine HEN1 afin de les protéger d'une dégradation rapide. Enfin, ces piRNA primaires s'apparient de manière partielle ou totale avec l'ARNm cible et entraînent le clivage de celui-ci au niveau du 10^e nucléotide en aval de l'extrémité 5'U. Ce clivage donne naissance à un nouveau piRNA, nommé piRNA secondaire, formé par le fragment d'ARNm ainsi généré et caractérisé par une adénosine en position 10 par complémentarité avec l'Uridine portée en position 1 par le piRNA primaire. Ce piRNA secondaire subit à son tour une méthylation par HEN1 pour assurer sa protection et peut être reconnu par la protéine Argonaute3 pour cliver un pre-piRNA en 1U piRNA. Ce phénomène dit « ping pong » permet une amplification de l'extinction génique par les piRNA et favorise une action rapide contre les transposons dans les cellules germinales par

une faible quantité de piRNA puisque ceux-ci peuvent être réutilisés pour fixer plusieurs ARNm cibles⁽³²⁾.

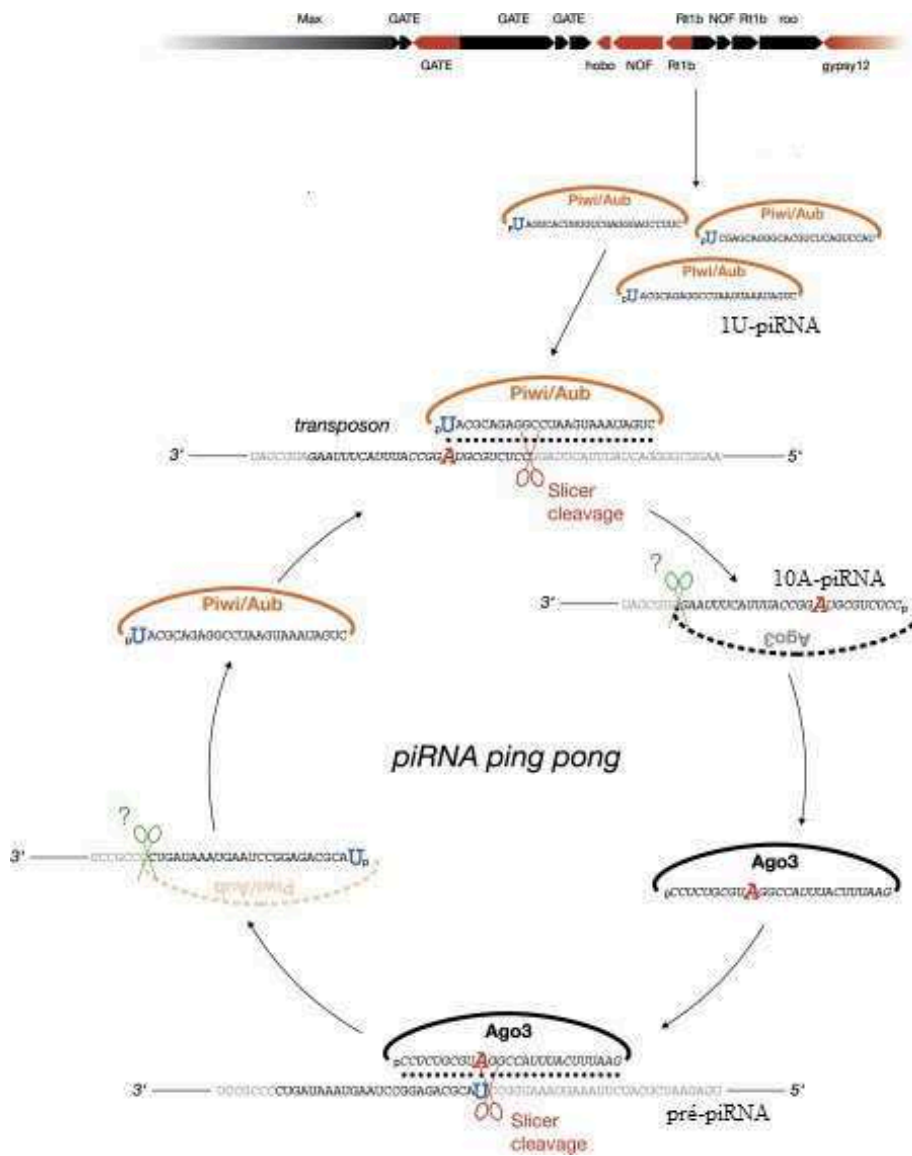


Figure 14 : Voie des piRNA et phénomène "ping pong"⁽³¹⁾

2. Intérêts et limites de l'utilisation de siRNA en oncologie

La compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'ARN interférence ont permis d'entrevoir une utilisation en thérapeutique. Le mode d'action des ARN interférents, en agissant sur une séquence d'ARNm précise, leur confère une grande spécificité dans le choix de la cible à inhiber.

De plus, contrairement à la plupart des thérapies actuelles qui ciblent des protéines telles que des enzymes ou des récepteurs, les siRNA peuvent en théorie agir sur n'importe quelle cible par appariement de base avec l'ARNm d'intérêt.

Enfin, les siRNA sont d'une grande efficacité dans l'inhibition des gènes surexprimés car quelques copies sont capables de provoquer une extinction génique conduisant à un effet thérapeutique. La capacité des siRNA à être recyclés après la dégradation d'un ARNm grâce à la protection apportée par le RISC augmente l'efficacité des ARN interférents en thérapeutique par rapport aux oligonucléotides antisens. Ces molécules, utilisées depuis 1978 pour inhiber les ARNm⁽³³⁾, possèdent la même spécificité d'action que les siRNA en agissant par complémentarité de séquence avec leur cible. En revanche, ils nécessitent d'être administrés en plus grande quantité car ils sont dégradés en même temps que leur cible par les RNAses H cytoplasmiques.

Après avoir détaillé les différentes molécules pouvant mettre en œuvre l'ARN interférence *in vivo*, cette partie sera consacrée à la description des paramètres influençant leur application (cible, séquence, obstacles) en tant qu'outil thérapeutique en oncologie, en se focalisant sur l'utilisation des siRNA.

2.1. Choix de la molécule d'ARN interférence

A partir des connaissances apportées par l'étude des mécanismes mis en œuvre dans l'ARN interférence, trois types de molécules ont été synthétisés afin d'inhiber de manière exogène l'expression d'un gène ciblé, les longs ARN double brin, les « *short hairpin RNA* » (shRNA) et les siRNA⁽³⁴⁾ (Figure 15).

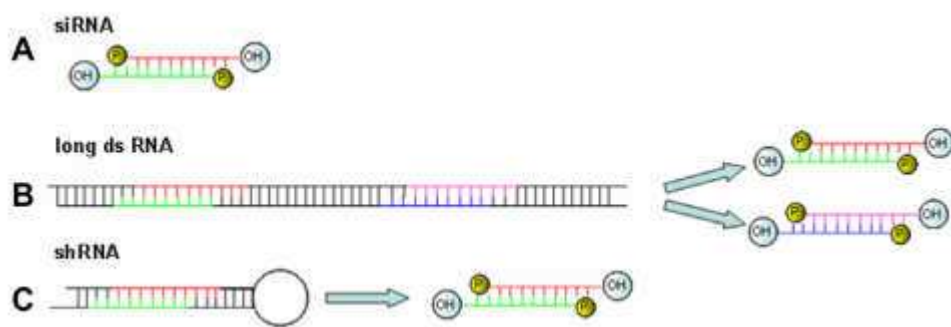


Figure 15 : effecteurs exogènes de l'ARNi

Les longs ARN double brin synthétiques se composent de deux brins parfaitement complémentaires de plus de 30 paires de bases. Après leur incorporation dans la cellule, ceux-ci sont pris en charge par DICER et clivés en petits ARN type siRNA. Leur longue chaîne permet, par le clivage orchestré par DICER, de former plusieurs siRNA agissant sur une cible unique ou, en variant la composition interne, de libérer des siRNA inhibant des cibles différentes. L'administration de cette longue chaîne d'ARN double brin dans le but d'entraîner l'extinction d'un gène pose néanmoins un problème majeur puisqu'elle favorise une réponse immunitaire rapide de la part des cellules spécialisées. Pour limiter la réponse immunitaire induite par les longs ARN doubles brins, des « *Dicer substrate short interfering RNA* » (dsRNA) ont été conçus⁽³⁵⁾. Ces ARN doubles brins de 25 à 27

nucléotides sont clivés en siRNA par DICER. Leur taille, inférieure à 30 nucléotides, limite la réponse immunitaire induite par les PKR tandis que la prise en charge par DICER semble augmenter l'activité et la durée d'action par rapport aux siRNA.

Les « *short hairpin RNA* » (shRNA) sont des analogues synthétiques des pre-miRNA endogènes. Ils possèdent une structure tige-boucle mais contrairement aux pre-miRNA, les deux brins de la tige s'apparient de manière parfaitement complémentaire⁽³⁶⁾. Comme les pre-miRNA, les shRNA sont pris en charge par DICER qui les clive en molécules du même type que les siRNA. Les shRNA sont très efficaces pour inhiber l'expression génique et ce sur une durée assez longue. Ils peuvent être synthétisés directement dans la cellule. Leur transfection nécessite alors la vectorisation d'un plasmide ADN dans un vecteur viral ou non qui doit être acheminé vers le noyau, ce qui augmente la difficulté d'internalisation et le risque de survenue d'effets indésirables liés à l'utilisation d'ADN et de vecteurs. En effet, l'ADN plasmidique peut s'insérer de manière aléatoire dans le génome humain et être responsable de mutations favorisant la survenue de cancers.

Les siRNA synthétiques ont une structure de 19 à 22 nucléotides semblables aux siRNA endogènes. Leur synthèse chimique est facile. Ils sont particulièrement intéressants pour une utilisation en thérapeutique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'extinction génique qu'ils apportent peut être contrôlée dans le temps du fait de l'absence d'intégration au génome contrairement aux thérapies basées sur l'ADN et n'entraînent pas de risques mutagènes ou tératogènes. De plus, ils n'ont pas besoin d'être acheminés jusqu'au noyau, facilitant l'internalisation cellulaire. Enfin, l'extinction génique peut être apportée par une faible quantité de siRNA puisque le brin incorporé au RISC est protégé des nucléases cytosoliques et peut être réutilisé pour interagir avec plusieurs ARNm cibles. Les miRNA

peuvent également être utilisés pour inhiber l'expression génique⁽³⁶⁾. Contrairement aux siRNA qui sont spécifiques d'une cible, un miRNA est capable d'interagir avec plusieurs cibles par complémentarité imparfaite. Bien qu'intéressante, cette capacité nécessite une connaissance parfaite des interactions entre le miRNA et ses cibles.

2.2. Choix de la cible

Pour agir efficacement sur les cellules cancéreuses en limitant les effets indésirables sur les cellules saines, les siRNA doivent respecter certaines règles quant aux gènes qu'ils vont inhiber. Ainsi, les ARNm cibles doivent être des acteurs cruciaux dans le développement, la progression tumorale ou la résistance aux chimiothérapies, être exprimés préférentiellement au niveau des cellules cancéreuses et présentant un niveau d'expression supérieur aux cellules saines. De plus, ils doivent être associés à un développement spontané de tumeurs dans les modèles animaux et dans l'idéal ne pas entraîner la mort des cellules saines.

La demi-vie des ARNm ciblés module également l'action des siRNA. Le ciblage des ARNm à demi-vie courte entraîne une action rapide mais transitoire alors qu'inversement le ciblage des ARNm à demi-vie longue entraîne un effet biologique retardé mais prolongé dans le temps⁽³⁷⁾. La durée d'action des siRNA dépend également de la vitesse de division cellulaire. La division rapide des cellules entraîne une diminution de l'effet par dilution des siRNA.

Les cibles potentielles en cancérologie sont nombreuses (Figure 16). Les siRNA peuvent interagir avec les ARNm impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la progression tumorale, l'angiogenèse et la résistance aux chimiothérapies.

2.2.1. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est contrôlé à chaque étape par de nombreux effecteurs. La cycline B1, par exemple, est impliquée dans la transition G2/M. Elle constitue une cible car elle est surexprimée dans différents types de cancers (œsophagien, pulmonaire, prostatique, ...). Crombez et Morris⁽³⁸⁾ ont développé un siRNA ciblant la cycline B1 entraînant un blocage de la mitose cellulaire et une réduction significative de la croissance de carcinomes prostatiques chez des souris.

PLK1 et MAD2, deux protéines régulant le cycle cellulaire, représentent des cibles potentielles pour bloquer le cycle cellulaire en raison de la corrélation entre leur surexpression et la survenue de cancers⁽³⁹⁾.

2.2.2. Prolifération cellulaire

Les tumeurs produisent de manière excessive des facteurs de croissance (ex : IGF, EGF,...) même si elles peuvent s'émanciper de ces facteurs pour leur progression. Les gènes *epha2*, *pik3* sont des cibles préférentielles pour limiter la prolifération cellulaire. L'administration de siRNA anti-EphA2 a montré une diminution de la taille tumorale et de la prolifération cellulaire chez des souris porteuses de tumeurs ovariennes⁽⁴⁰⁾.

2.2.3. Mort cellulaire

La dérégulation des voies d'apoptose est un point clé dans le développement des tumeurs. Le ciblage des gènes *bcl-2*, *survivine* ou *mcl-1*, permet par exemple de rétablir l'apoptose cellulaire au sein des cellules cancéreuses. L'administration de siRNA-anti Bcl-

2 a montré une réduction de la taille tumorale par restauration de l'apoptose dans un modèle murin⁽⁴¹⁾.

2.2.4. Angiogénèse

Le développement rapide des tumeurs implique la formation de nouveaux capillaires pour assurer l'apport d'oxygène et de nutriments. Inhiber les gènes *vegf* ou *par-1* empêche la formation de néovaisseaux nécessaires au développement cellulaire. Guo et Cheng ont observé une diminution de la croissance tumorale après administration systémique de siRNA ciblant le VEGF⁽⁴²⁾.

2.2.5. Résistance aux chimiothérapies

L'inhibition du gène *mdr* permet d'augmenter l'efficacité des chimiothérapies en inhibant les pompes d'efflux de médicaments. Une étude d'administration concomitante de Doxorubicine et de siRNA anti-MDR chez des souris a montré une accumulation accrue de Doxorubicine associée à une diminution significative du volume tumoral par rapport à l'administration de Doxorubicine seule⁽⁴³⁾. Ces résultats sont prometteurs pour surpasser la chimiorésistance développée dans certains types de tumeurs.

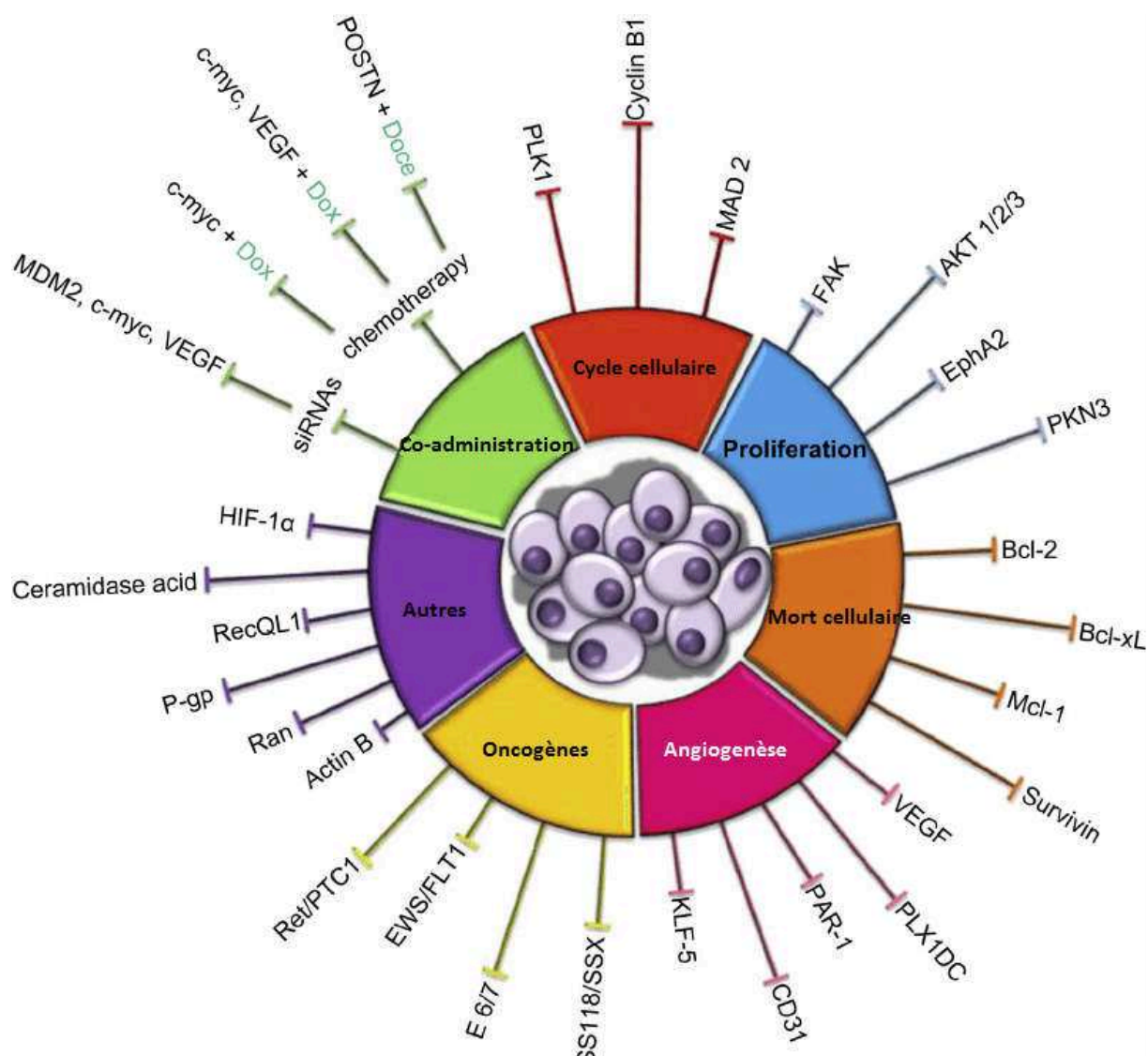


Figure 16 : Cibles potentielles des siRNA en oncologie⁽³⁹⁾

2.3. Choix de la séquence du siRNA ⁽⁴⁴⁾

Le choix de la séquence du siRNA synthétisé pour agir en tant qu'agent thérapeutique comprend plusieurs étapes. La localisation de la séquence à cibler, la longueur et la structure secondaire du siRNA, la sélection du brin guide par le RISC à partir des deux brins de siRNA, la composition en nucléotides sont autant de données à prendre en compte

pour améliorer l'efficacité et la spécificité du siRNA synthétisé mais aussi pour limiter la survenue d'effets secondaires (Tableau 2).

Le premier paramètre à prendre en compte est la localisation de la séquence complémentaire du siRNA sur l'ARNm cible. Les régions situées environ 50 à 100 nucléotides en aval du codon start de l'ARNm cible, au niveau de l'ORF (Open Reading Frame), semblent les séquences les plus à même de favoriser une extinction génique efficace. Les introns et les régions 3'UTR et 5'UTR sont à éviter car moins spécifiques, ces régions UTR étant partagées par de nombreux ARNm⁽⁴⁵⁾. De plus, les régions UTR et les séquences proches du codon start subissent l'action de protéines régulatrices qui pourraient gêner la fixation du RISC⁽⁴⁶⁾. Enfin, le niveau d'accessibilité de la séquence de l'ARNm cible détermine la capacité de fixation du siRNA. Le repliement de l'ARNm par formation de structures secondaires complexes bloque l'accès du RISC à sa cible. Celui-ci ne pourra pas déplier la séquence d'ARNm sur laquelle il est censé se fixer.

La séquence nucléotidique des deux brins du siRNA synthétisé conditionne l'efficacité, le bon déroulement des différentes étapes menant à l'extinction génique et la spécificité de l'action. De multiples algorithmes ont vu le jour pour sélectionner la meilleure séquence en nucléotides pour concevoir les siRNA à visée thérapeutique⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾. Leur objectif est d'augmenter l'asymétrie entre les deux brins pour favoriser l'incorporation du brin complémentaire de l'ARNm cible au sein du RISC et non le brin passager, d'empêcher la formation de structures complexes avec l'ARNm cible conduisant à une diminution de l'efficacité et limiter la reconnaissance par le système immunitaire.

La conception des deux brins du siRNA doit faciliter la dégradation du brin passager en créant une asymétrie dans la stabilité thermodynamique à ses extrémités. Le brin guide doit

être pourvu d'une extrémité 5' thermodynamiquement moins stable que celle du brin passager. Cette asymétrie est augmentée lors de la synthèse des siRNA en incorporant des bases Adenosine (A) et Uridine (U) à l'extrémité 5' du brin guide et des bases Cytidine (C) et Guanosine (G) à l'extrémité 5' du brin passager. En effet, contrairement aux bases C et G qui s'apparient *via* trois liaisons hydrogène, les liaisons A-U entre les deux brins de siRNA s'apparient à travers deux liaisons hydrogène seulement (Figure 17, Figure 18). La stabilité d'hybridation des deux brins est donc plus faible.

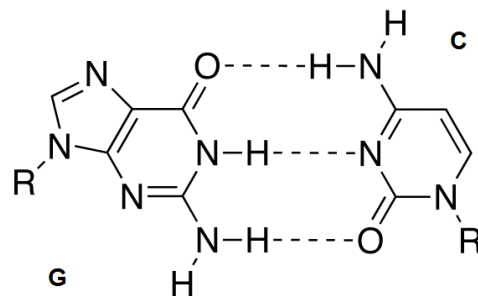


Figure 17 : appariement G-C via trois liaisons hydrogène

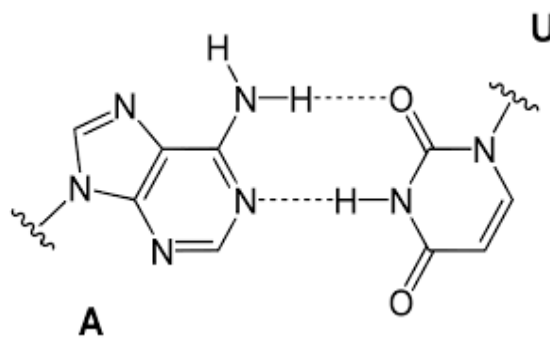


Figure 18 : appariement A-U via deux liaisons hydrogène

Tandis que les extrémités du siRNA affectent la sélection du brin sur le RISC, la partie centrale affecte quant à elle son activité. Il semblerait qu'une séquence comportant entre 36 et 52% de G et C permette de stabiliser le siRNA sur l'ARNm. Une teneur en G/C supérieure conduit à une inhibition du chargement sur le RISC et de la dégradation du brin passager par liaison trop forte entre les deux brins tandis qu'une teneur inférieure restreint la fixation du brin guide sur l'ARNm. La présence de motifs répétés ou palindromiques au sein du siRNA, tels que GGGG ou GGCAUCGG, favorise la formation de repliements internes diminuant leur l'efficacité.

Enfin, une région située entre les 9^e et 14^e nucléotides (« *energy valley* ») instable par la présence de A et U permet au RISC d'induire la meilleure conformation pour entraîner le clivage de l'ARNm cible. La présence d'un U est particulièrement recommandée au niveau du 10^e nucléotide, lieu de clivage de l'ARNm par Ago2 : la plupart des endonucléases préfèrent cliver leur substrat en 3' d'un U plutôt que d'une autre base⁽⁴⁹⁾.

Tableau 2 : Principaux paramètres pour la synthèse de siRNA fonctionnels

Cible	Favoriser les régions 50 à 100 nucléotides en aval du codon start Eviter les séquences d'ARNm repliées
Asymétrie entre les deux brins de siRNA	Présence A/U à l'extrémité 5' du brin guide Présence G/C à l'extrémité 5' du brin passager
Complémentarité et liaison avec l'ARNm	Appariement parfait au niveau de la « seed sequence » Présence 36 à 52% G/C Absence de répétitions internes
Activité du RISC	Présence A/U au niveau de l' « energy valley » U en position 10 sur le brin passager Présence A en position 3 et 9 sur le brin passager

2.4. Choix de la voie d'administration

La voie d'administration des siRNA est un paramètre important car elle conditionne la dose totale nécessaire, la distribution tissulaire, les effets indésirables potentiels, ainsi que la nécessité d'apporter des modifications chimiques et de vecteurs facilitant l'administration.

L'administration per os de siRNA apparaît difficile à mettre en œuvre du fait de la sensibilité des acides nucléiques au pH gastrique acide. L'administration par voie locale permet une biodisponibilité élevée en limitant les effets indésirables systémiques. Différentes voies telles que la voie cutanée⁽⁵⁰⁾, intra-vésicale, intra péritonéale, intra-nasale

ou intra-tumorale⁽⁵¹⁾ ont déjà été étudiées dans le traitement de tumeurs non métastatiques. Yan et Zhou ont par exemple développé un aérosol délivrant efficacement des siRNA dans un modèle murin de tumeur pulmonaire⁽⁵²⁾. Seth et Matsui ont montré une réduction de la taille tumorale chez des souris porteuses de tumeurs de la vessie après injection intravésicale de siRNA⁽⁵³⁾.

L'utilisation des voies locales est cependant limitée aux tumeurs accessibles. L'administration par voie intraveineuse demeure la voie préférentielle dans le traitement des tumeurs car elle permet une distribution tissulaire large. Néanmoins, de nombreux obstacles se dressent lors de l'utilisation de cette voie, limitant une utilisation à grande échelle des siRNA.

2.5. Challenges de l'utilisation de siRNA *in vivo*

2.5.1. Stabilité et clairance plasmatique

Dans le sérum et les milieux extracellulaires, les siRNA « nus » ont une demi-vie allant de quelques minutes à une heure car ils sont rapidement reconnus et dégradés par les ribonucléases plasmatiques⁽⁵⁴⁾.

De plus, les particules inférieures à 50 kDa telles que les siRNA (environ 15kDa) sont rapidement excrétées par les reins. Ainsi, après l'administration intraveineuse de siRNA « nus », la quantité retrouvée au niveau des reins est 40 fois supérieure à celle dosée dans les autres organes.

Enfin, le Système Réticulo-endothélial (SRE), composé de macrophages (notamment les cellules de Kupffer représentant 35% de la composition hépatique et les macrophages

spléniques) et de monocytes circulants, a pour but de capturer et détruire les fragments cellulaires et les pathogènes. Les siRNA sont ainsi rapidement reconnus comme des agents pathogènes.

2.5.2. Internalisation cellulaire et échappement endosomal

La taille et le caractère polyanionique des siRNA empêchent leur diffusion simple à travers la membrane plasmique elle-même-chargée négativement. Leur entrée dans la cellule nécessite donc d'utiliser la voie d'endocytose. Or, par cette voie, les siRNA sont internalisés dans des vésicules endosomales primaires (pH 7,4), qui fusionnent avec des endosomes de tri et forment des endosomes tardifs. Le pH dans ceux-ci diminue jusqu'à pH 5-6 par l'action de pompes à protons ATP-dépendantes fixées sur la membrane endosomale. Enfin, le contenu endosomal est transféré dans des lysosomes où, le pH~4,5 et l'action de nucléases dégrade les siRNA⁽⁵⁵⁾.

2.5.3. Réponse immunitaire

La réponse immunitaire innée engendrée par les siRNA est un effet indésirable majeur limitant leur utilisation en thérapeutique. En effet, l'administration de siRNA « nus » chez l'Homme provoque la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type I, se traduisant par un syndrome inflammatoire. Deux grandes voies sont activées par les siRNA, la réponse médiée par les récepteurs Toll-Like (TLR) et la réponse non dépendante des TLR⁽⁵⁶⁾ (Figure 19).

2.5.3.1. Réponse dépendante des TLR

Parmi les dix récepteurs Toll-Like recensés chez l'Homme, seuls trois peuvent reconnaître les siRNA et induire une réponse immunitaire : les TLR 3, 7 et 8.

2.5.3.1.1. TLR 3

TLR3 est exprimé à la surface de cellules immunitaires notamment des cellules dendritiques plasmacytoïdes, et des lignées cellulaires endothéliales, épithéliales et fibroblastiques ainsi qu'au niveau des endosomes de certains types cellulaires. La reconnaissance par TLR3 des siRNA dépend de la longueur de la double chaîne d'acides nucléiques et varie en fonction de la lignée cellulaire⁽⁵⁶⁾.

La voie de signalisation, après l'activation de TLR3, implique la protéine adaptatrice TRIF qui interagit avec⁽⁵⁷⁾ :

- TRAF3 et TRAF6 pour conduire, après une cascade de réactions impliquant le recrutement de kinases, à la production d'IFN β
- RIP1 et TRAF6 afin de synthétiser des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α .

2.5.3.1.2. TLR 7 et 8

TLR 7 et 8 sont exprimés dans les vésicules intracellulaires (endosomes, lysosomes, ...) des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des cellules myéloïdes. L'activation de ces récepteurs par les siRNA est dépendant de la séquence en acides nucléiques. Ainsi, TLR 7 et 8 sont plus facilement stimulés par des séquences incluant des motifs riches en Guanosine (G) et Uridine (U) ou de régions poly-U. De plus, le motif 5'-UGU-3' semble activer fortement la réponse immunitaire médiée par les TLR 7 et 8 alors que les régions

riches en Adénosine (A) et Uridine stimulent préférentiellement TLR 8. Cette stimulation dépendante de la séquence doit être prise en compte lors de la sélection et du développement de siRNA afin de limiter la survenue de réponses immunitaires⁽⁴⁵⁾.

La fixation du siRNA sur le TLR 7 ou 8 entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88, qui après interaction avec TRAF3 et TRAF6 conduit à la surexpression de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN α ⁽⁵⁶⁾.

2.5.3.2. Réponse indépendante des TLR

En parallèle des récepteurs Toll-Like, les cellules de mammifères possèdent des mécanismes indépendants de reconnaissance d'ARN exogènes signes d'intrusions virales ou d'administration de siRNA synthétiques. Trois récepteurs cytoplasmiques sont régulièrement associés à la détection d'ARN double brin, la protéine Retinoic acid Inducible Gene 1 (RIG-1), Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 (MDA-5) et Protein Kinase Receptor (PKR)⁽⁴⁵⁾⁽⁵⁶⁾.

RIG-1 est un senseur cytoplasmique des ARN double brin produits par réplication virale retrouvé dans les fibroblastes, dans les macrophages et dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes. Il est capable de lier des siRNA en fonction de leur taille et indépendamment de leur séquence. La reconnaissance par RIG-1 se fait au niveau de l'extrémité 5'phosphorylée des siRNA. En revanche, le non appariement de deux nucléotides à l'extrémité du siRNA semble diminuer la réponse immunitaire induite par RIG-1. Une fois activé, RIG-1 entraîne la production d'IFN β après association à la protéine adaptatrice IPS-1.

MDA-5 est également un senseur cytoplasmique des ARN double brin et induit une réponse similaire à l'activation de RIG-1 mais ses mécanismes et ses cibles sont encore méconnus.

Enfin, les PKR sont des récepteurs cytoplasmiques activés généralement par des ARN double brin de plus de 30 paires de bases. Leur implication dans une réponse immunitaire suite à l'introduction de siRNA n'a pas été clairement démontrée.

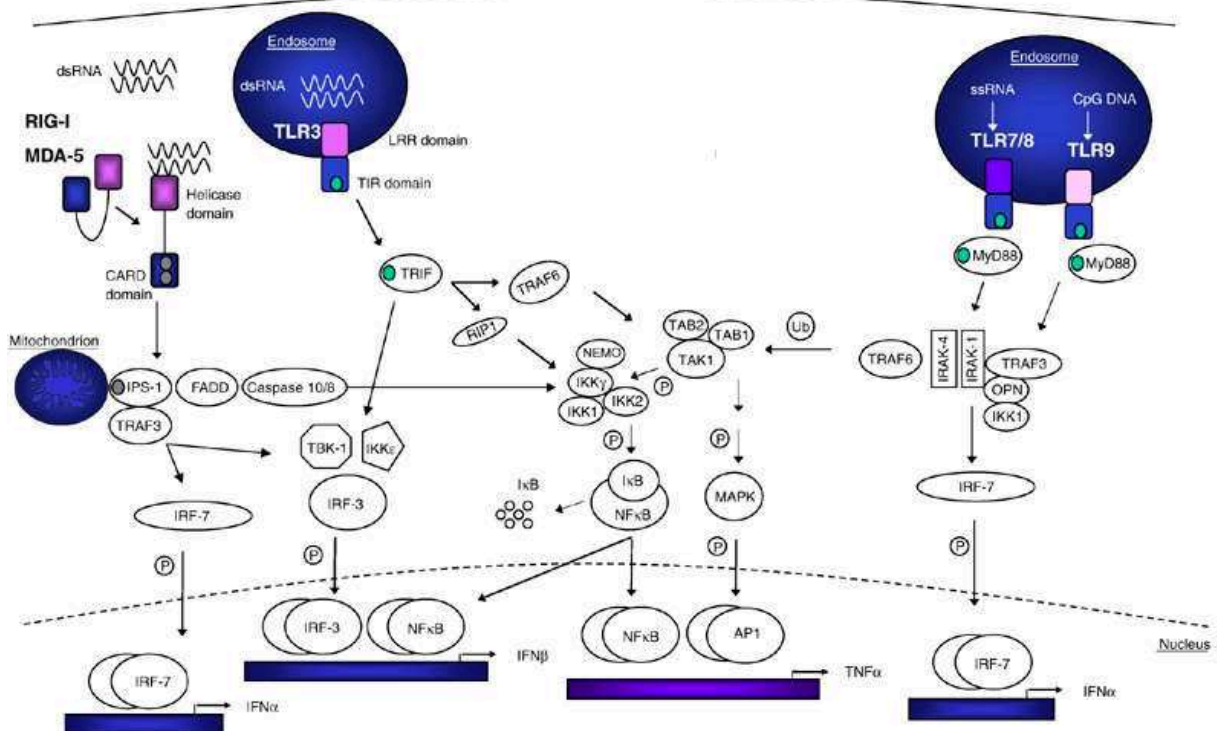


Figure 19 : réponse immunitaire après activation des voies TLR dépendantes et TLR non dépendantes⁽⁵⁶⁾

2.5.3.3. Effets bénéfiques de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire est perçue comme un effet indésirable lors de l'administration de siRNA. Or, l'immunostimulation pourrait être utilisée pour lutter contre les tumeurs. La

production d'IFN α et d'IFN β semblent être à l'origine d'une réduction de l'angiogénèse par inhibition de l'expression du VEGF⁽⁵⁸⁾. Ainsi, l'administration de siRNA capables d'activer localement une réponse immunitaire pourrait potentialiser leur action anti tumorale.

Poock et son équipe ont injecté des siRNA anti-Bcl2 possédant une extrémité 5'-triphosphate chez des souris porteuses de métastases pulmonaires de mélanome⁽⁵⁹⁾. Le siRNA-anti-Bcl2 inhibe l'expression dérégulée de la protéine anti-apoptotique Bcl2 au sein des cellules tumorales tandis que l'extrémité 5'-triphosphate active spécifiquement RIG-I, conduisant à la production d'IFN de type I et le recrutement de cellules NK. La double action des siRNA-anti Bcl2 5'-triphosphate entraîne une réponse antitumorale synergique comparée à l'injection de siRNA anti-Bcl2 non phosphorylés.

L'extrapolation chez l'Homme de résultats obtenus sur des modèles animaux n'est toutefois pas automatique comme en témoigne le drame survenu en 2006, en Angleterre, lors de l'essai clinique de Phase I du TGN1412. Cet anticorps monoclonal ciblant le récepteur CD28 à la surface des lymphocytes T a été développé dans le but d'engendrer une immunostimulation chez des patients atteints de leucémies. Malgré l'absence d'effets indésirables chez la souris et le singe, la première injection chez six sujets sains a entraîné un syndrome de relargage des cytokines ayant conduit à une admission en soins intensifs pour les six patients et à des séquelles chez cinq d'entre eux⁽⁶⁰⁾.

Les effets non spécifiques de l'immunostimulation et les mécanismes d'activation de la réponse immunitaire doivent donc être approfondis avant d'envisager une utilisation positive en oncologie.

2.5.4. Effets hors cibles (« *off target* »)

Les siRNA sont des ARN double brin synthétisés pour obtenir un appariement parfaitement complémentaire entre le brin guide et l'ARNm cible. Or, il est possible que ces siRNA induisent une extinction génique sur des ARNm hors cibles (« *off target* ») par deux mécanismes distincts : type miRNA ou médié par le brin passager. Ces effets hors cibles sont un problème puisqu'ils entraînent une modification de l'expression génique ayant un retentissement sur le fonctionnement des cellules saines.

2.5.4.1. Voie miRNA-like

Comme nous l'avons vu précédemment dans le mécanisme d'action des miRNA, une complémentarité parfaite n'est pas indispensable pour obtenir une extinction génique. Ainsi, le brin guide peut, en plus de la complémentarité parfaite avec l'ARNm cible, interagir avec une homologie imparfaite avec un ARNm différent et provoquer l'ARN interférence dès lors que la « *seed region* » (région située du 2^e au 8^e nucléotide de l'extrémité 5') du brin guide s'apparie avec l'ARNm. Il en résulte l'inhibition de la traduction avec des effets indésirables corrélés à l'importance de la protéine inhibée⁽³⁹⁾.

2.5.4.2. Voie médiée par le brin passager

L'incorporation du brin passager à la place du brin guide au sein du RISC modifie l'ARNm ciblé et participe à la survenue d'effets indésirables similaires aux effets « hors cibles » induits par la voie miRNA-like.

L'administration de la dose minimale de siRNA permet de diminuer le risque de survenue d'effets « hors cibles ». Le choix de la séquence des deux brins du siRNA est

primordial pour limiter l'incorporation du brin passager et maximiser l'efficacité du brin guide. De nombreux algorithmes, tels que RNAXs⁽⁶¹⁾, siDESIGN Center⁽⁴⁷⁾ ou siDirect⁽⁴⁸⁾, permettent de concevoir des siRNA ayant une grande spécificité pour une cible donnée.

2.5.5. Saturation de la machinerie d'ARN interférence

L'utilisation d'une grande quantité de siRNA provoque un phénomène de compétition avec les effecteurs endogènes de l'ARN interférence, conduisant à la saturation de la machinerie d'extinction génique⁽⁶²⁾. Or, cette saturation par les siRNA exogènes inhibe la régulation génique normale en bloquant l'accès des petits ARN endogènes au RISC. Les effets sont alors dramatiques car la saturation empêche la mise en place de l'ensemble de la voie d'extinction génique post-transcriptionnelle.

Ce phénomène peut être cependant limité par la réduction de la quantité de siRNA administrée mais implique d'augmenter l'efficacité de ceux-ci pour induire un effet thérapeutique avec une quantité de siRNA la plus faible possible.

3. Solutions pour améliorer la délivrance systémique des siRNA

3.1. Modifications chimiques du siRNA

Les modifications chimiques permettent une stabilisation du siRNA dans les conditions physiologiques et une diminution de l'immunogénicité. De plus, la modification des extrémités du siRNA peuvent influencer la sélection du brin par le RISC.

Ces modifications peuvent être introduites^{(63) (64)} :

- au niveau d'une base : 5-methyl Uridine, pseudo Uridine, dihydro Uridine,...
- au niveau d'un ose : 2'-O-methyl ARN, 2'-F ARN, acide nucléique bloqué (« *Locked Nucleic Acid* », LNA), « *Unlocked Nucleic Acid* » (UNA), ...
- au niveau du squelette : boranophosphate, phosphorothioate, ...

La position 2' hydroxylée sur l'ose des nucléotides est la position préférentielle pour les modifications car elle n'est pas requise pour la reconnaissance par la machinerie d'ARN interférence. Les modifications à ce niveau visent donc à augmenter la stabilité des siRNA et semblent réduire la réponse immunitaire. La modification la plus couramment utilisée est la méthylation de cette position 2' (Figure 20). Outre la stabilisation vis-à-vis des nucléases et la diminution de la réponse immunitaire, la méthylation de l'extrémité 5' du brin passager empêche sa phosphorylation dans le cytoplasme, nécessaire à la reconnaissance du brin par le domaine MID de la protéine Argonaute. Ainsi, elle limite les effets « off target » induits par le brin passager. Le remplacement du 2'-OH par 2'-Fluor conduit également à l'augmentation de la stabilité des siRNA (Figure 21)⁽⁶⁵⁾. Allerson et Sioufi ont synthétisé un siRNA modifié par substitution complète des positions 2'-OH par

2'-O-methyl en alternance avec 2'-Fluor. Ces modifications ont montré une activité d'extinction génique supérieure aux siRNA non modifiés⁽⁶⁶⁾.

Le clivage de la liaison 2'-3', formant les « *Unlocked Nucleic Acid* » (UNA) augmente la flexibilité moléculaire du siRNA et diminue la stabilité thermodynamique du brin de siRNA (Figure 22). La présence d'UNA sur l'extrémité 3' du brin passager ou à l'extrémité 5' du brin guide (à l'exclusion des derniers nucléotides) semble apporter une instabilité thermodynamique susceptible de favoriser l'intégration du brin guide sur le RISC au détriment du brin passager⁽⁶⁷⁾.

Inversement le blocage de la position 3' par un pont méthylène entre les positions 2' et 4', formant les LNA (« *Locked Nucleic Acid* ») peut être utilisé pour augmenter la résistance du siRNA aux nucléases ainsi que la stabilité thermodynamique de l'extrémité 5' du brin passager de siRNA et réduire l'immunostimulation induite par les siRNA (Figure 23). Ces modifications ne doivent néanmoins pas être appliquées sur les nucléotides en position 10, 12 et 14 du brin guide car elles entraînent l'abolition de l'effet des siRNA⁽⁴⁾.

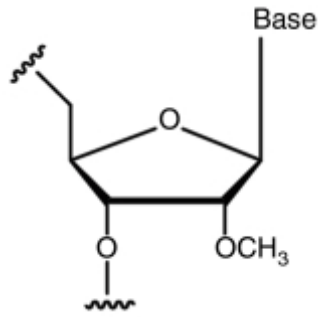


Figure 20 : 2'-O-méthyl RNA

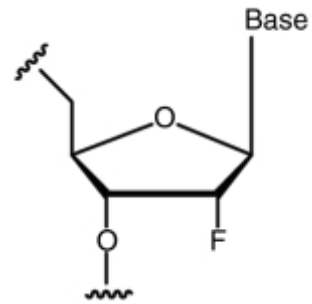


Figure 21 : 2'-F RNA

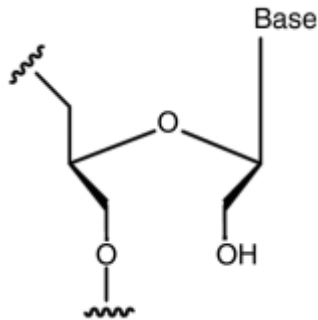


Figure 22 : Unlocked Nucleic Acid (UNA)

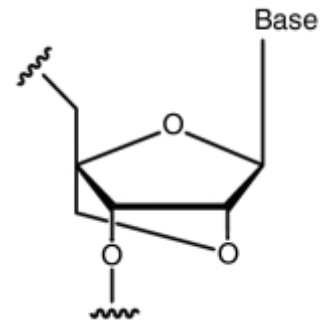


Figure 23 : Locked Nucleic Acid (LNA)

La modification du phosphate internucléotidique permet également d'améliorer la stabilité des siRNA vis-à-vis des nucléases, d'augmenter la liaison aux protéines plasmatiques et l'internalisation cellulaire. Le remplacement de cette position par un groupement phosphorothioate (Figure 24) ou boranophosphate (Figure 25) stabilise le siRNA dans le sérum plasmatique et facilite son internalisation cellulaire. La modification par un groupement phosphorothioate sur les nucléotides en position 3, 5 et 17 du brin passager semble augmenter l'effet des siRNA en favorisant le chargement du brin guide

dans le RISC. En revanche, un degré de modifications phosphorothioate trop important majore la toxicité des siRNA, par liaison non spécifique avec les protéines membranaires⁽⁶⁸⁾.

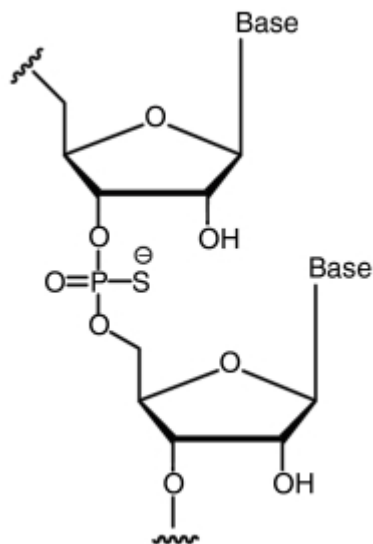


Figure 24 : Phosphorothioate

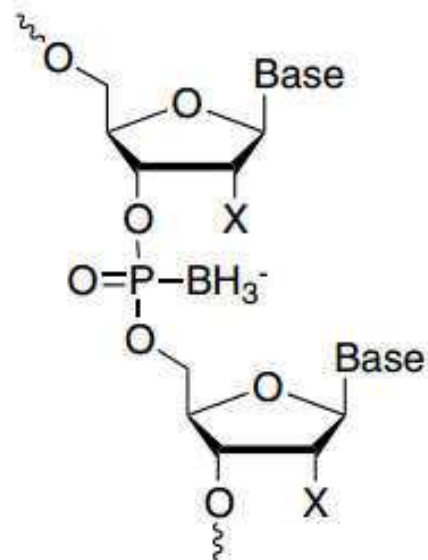


Figure 25 : Boranophosphate

Bien qu'elles apportent des avantages quant à la stabilité en conditions physiologiques ou l'activation de la réponse immunitaire, les modifications chimiques au sein du siRNA doivent être contrôlées pour qu'elles évitent d'intervenir entre le 2^e et le 8^e nucléotide. De plus, il est préférable de favoriser les modifications sur le brin passager afin de limiter la perte d'activité que pourraient engendrer les ajustements sur le brin guide ainsi que la survenue d'effets « off target ».

3.2. Conjugaison au siRNA

Les modifications chimiques permettent d'augmenter la stabilité des siRNA mais leur taille et leur caractère polyanionique sont un frein à la distribution et l'internalisation cellulaire efficace *in vivo*. La conjugaison à d'autres molécules permet d'améliorer les propriétés des siRNA par une synthèse relativement simple. Les molécules sont préférentiellement liées au brin passager, par liaison covalente (clivable ou non) ou interaction électrostatique (exemple : biotine/streptavidine⁽⁶⁹⁾) afin de ne pas empêcher l'activité des siRNA⁽⁷⁰⁾.

3.2.1. Conjugaison à des lipides

La conjugaison au cholestérol facilite la circulation sanguine et l'accumulation hépatique des siRNA. En effet, après administration systémique, le cholestérol est transporté par les lipoprotéines HDL et LDL dans le sérum plasmatique vers les hépatocytes où ils sont internalisés *via* les récepteurs au HDL et LDL⁽⁷¹⁾.

Nishina et *al* ont montré que le couplage d' α tocophérol (vitamine E) avec des siRNA (Figure 26) était capable d'augmenter la demi-vie et l'accumulation spécifique des siRNA au niveau du foie, la vitamine E semblant s'associer à des protéines de liaison et de transfert spécifiques⁽⁷²⁾.

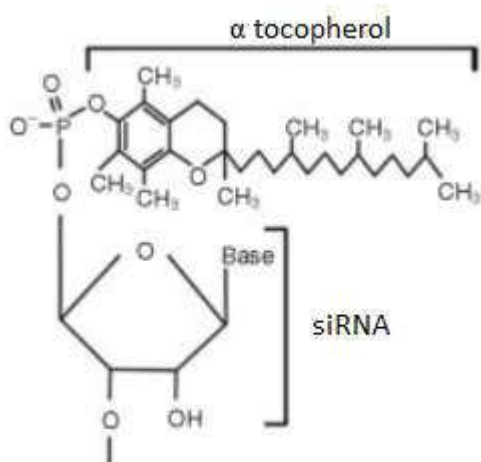


Figure 26 : siRNA conjugué à l' α -tocopherol⁽⁷²⁾

3.2.2. Conjugaison à des saccharides

Les structures saccharidiques des glycoprotéines contribuent notamment aux processus d'adhésion cellulaire. Les récepteurs lectin-like fixant ces structures saccharidiques sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Le mannose et le galactose peuvent être couplés aux siRNA pour faciliter l'internalisation cellulaire de ces derniers⁽⁷³⁾.

Anylam Pharmaceuticals[®] a développé un siRNA modifié par conjugaison de N-acetylgalactosamine (GalNAc, Figure 27). Le GalNAc se lie avec une grande affinité aux récepteurs de l'asialoglycoprotéine (ASGPR) présents à la surface des cellules hépatiques et permet une meilleure pharmacocinétique par rapport aux siRNA non conjugués⁽⁷⁴⁾.

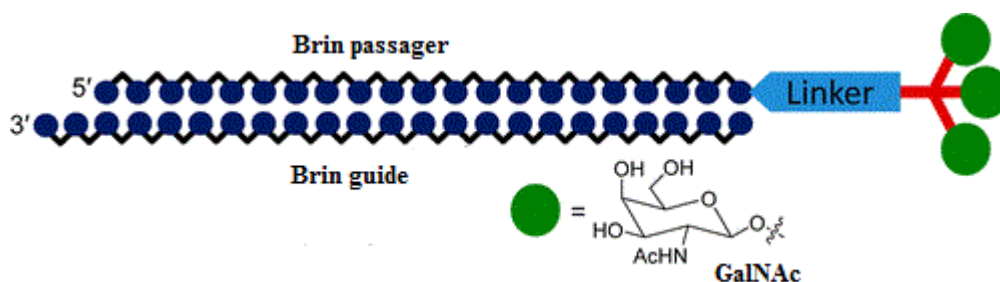


Figure 27 : siRNA conjugué à trois GalNAc⁽⁷⁴⁾

3.2.3. Conjugaison à des peptides de pénétration cellulaire

Les peptides de pénétration cellulaire (CPP) sont des petits peptides riches en acides aminés basiques, capables de faciliter l'internalisation cellulaire non médiée par un récepteur des molécules auxquelles ils sont couplés⁽⁷⁰⁾. De nombreux CPP ont fait l'objet d'études de conjugaison avec les siRNA, tels que la pénétratine⁽⁷⁵⁾ ou le transposan⁽⁷⁵⁾. Fang et *al* ont synthétisé un CPP, Tat-A1 ayant une grande affinité pour le récepteur VEGFR1 surexprimé dans de nombreuses tumeurs. La conjugaison de Tat-A1 avec des siRNA a conduit à une extinction génique comparable à celle obtenue par la Lipofectamine, un agent de transfection couramment utilisé *in vitro*⁽⁷⁶⁾.

3.3. Vectorisation des siRNA

L'utilisation des siRNA en tant qu'agent thérapeutique est fortement limitée par leurs propriétés physico-chimiques et l'instabilité de ces molécules dans les conditions physiologiques malgré l'apport des modifications chimiques et de la conjugaison. La vectorisation est une nécessité pour surpasser ces obstacles et faciliter leur délivrance jusqu'aux cellules cibles.

La vectorisation de siRNA par des systèmes nanométriques permet :

- d'augmenter la demi-vie des siRNA en limitant la clairance rénale rapide, la captation par le système réticulo-endothélial et en les protégeant de l'action des nucléases,
- de limiter l'activation du système immunitaire induite par les siRNA,
- d'assurer une bonne biodistribution par le ciblage spécifique des cellules cancéreuses limitant l'activité des siRNA dans les tissus sains,
- de faciliter le passage à travers les barrières physiologiques, de l'endothélium vasculaire à la membrane cellulaire puis l'échappement endosomal et la libération d'une quantité suffisante siRNA dans le cytoplasme.

Le choix des vecteurs utilisés est aussi important que la séquence des siRNA car tous les vecteurs ne sont pas adaptés au transport de siRNA. Les nanovecteurs doivent :

- avoir une capacité de chargement de siRNA en concentration à même de mener à un effet thérapeutique,
- être stables en milieu physiologique pour permettre une circulation de longue durée dans l'organisme,
- être biocompatibles et biodégradables pour faciliter leur élimination après la délivrance de leur contenu sans entraîner de réponse immunitaire,
- être non toxiques pour éviter la survenue d'effets secondaires par interaction avec les cellules saines.

Cette partie détaillera uniquement les vecteurs non viraux. Les vecteurs viraux, bien qu'ayant une capacité de vectorisation plus importante, voient leur utilisation se limiter à

cause de leurs propriétés mutagènes, immunogènes, pro-inflammatoires et en raison de leur coût de production élevé⁽⁷⁷⁾.

3.3.1. Définition

Selon la norme ISO/TS 80004-2 :15, les nano-objets sont définis comme des « objets dont une ou plusieurs dimensions externes sont à l'échelle nanométrique », c'est-à-dire compris entre 1 et 100nm. Cette définition comprend donc les nanoparticules, les nanofibres ou nanotubes et les nanofeuillets. La dimension de ces deux derniers types de nano-objets peut aller jusqu'à quelques millimètres⁽⁷⁸⁾.

En pratique, les nanovecteurs généralement utilisés pour le transport de siRNA à visée anticancéreuse ont une taille comprise entre 100 et 250 nm.

3.3.2. Evolution des nanovecteurs

Paul Ehrlich a été le premier, au début du XXe siècle, à imaginer la délivrance ciblée de médicaments à l'aide de « magic bullet »⁽⁷⁹⁾. Depuis, la recherche pour la vectorisation de médicaments a fait des progrès considérables et s'est accélérée ces vingt dernières années avec le développement des nanotechnologies. Il est possible de distinguer trois générations de nanovecteurs en fonction des évolutions successives ayant permis d'améliorer leurs caractéristiques.

3.3.2.1. Nanovecteurs de première génération

Les nanovecteurs de première génération sont représentés par la formation de colloïdes stables en milieu aqueux, capables d'intégrer des substances actives. Leur principal

objectif est de prolonger la demi-vie des substances vectorisées en limitant leur excrétion par les reins. Même si l'encapsulation dans ces vecteurs de première génération permet de ralentir l'élimination rénale, elle ne permet pas de maintenir une longue présence dans le sang. En effet, ces nanovecteurs sont rapidement repérés par les éléments du système immunitaire, subissent ensuite une opsonisation et sont captés puis dégradés par les macrophages du système réticulo-endothélial.

3.3.2.2. Nanovecteurs de deuxième génération

Dans le but de limiter la fixation d'opsonines et la reconnaissance par le système immunitaire, la surface des nanovecteurs de première génération a été recouverte d'une enveloppe protectrice pour former des nanovecteurs « furtifs ». Ceux-ci vont ainsi circuler plus longtemps dans l'organisme et accéder au tissu cible.

La technique la plus couramment utilisée pour rendre furtifs ces nanovecteurs est la PEGylation. Le Polyéthylène Glycol (PEG) est un polyéther synthétique très intéressant car biocompatible, hydrosoluble et apportant une stabilité stérique ainsi qu'une protection contre l'opsonisation (Figure 28)⁽³⁹⁾. Il confère un anneau hydrophile et flexible de charge négative qui masque la charge positive des nanovecteurs interagissant avec les siRNA polyanioniques⁽⁸⁰⁾.

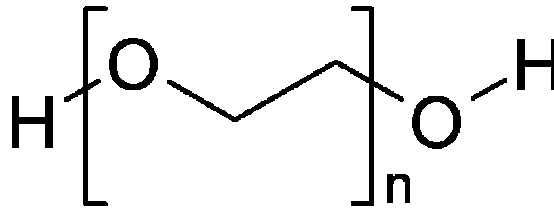


Figure 28 : Poly (éthylène glycol)

3.3.2.3. Nanovecteurs de troisième génération

Bien que la demi-vie des nanovecteurs soit considérablement augmentée par l'ajout d'une enveloppe protectrice, les nanovecteurs de deuxième génération sont incapables de reconnaître spécifiquement leur cible. Pour améliorer la délivrance ciblée des molécules transportées, une troisième génération de nanovecteurs a été développée en fonctionnalisant la surface des nanovecteurs furtifs avec des ligands de récepteurs spécifiques des cellules cibles ou surexprimés. Dans le cas précis du traitement anticancéreux, ces ligands peuvent être des anticorps, des aptamères ou des saccharides. Le ciblage des cellules tumorales sera détaillé dans le chapitre 3.4.

De nouvelles fonctionnalités ont récemment été apportées par l'ajout de molécules à visée diagnostique au sein des nanovecteurs transportant des molécules thérapeutiques. Ces nanovecteurs ayant donc à la fois des propriétés thérapeutiques et diagnostiques, ouvrent la voie au domaine nouveau de la « théranostique ». L'utilisation de ces nanovecteurs à potentialité théranostique permet un traitement personnalisé en assurant une thérapie ciblée associée à un contrôle en temps réel de la délivrance de la molécule thérapeutique.

3.3.3. Propriétés physico-chimiques des nanovecteurs de siRNA

Avant d'atteindre leur site d'action, à savoir les cellules tumorales, les nanovecteurs transportant des siRNA sont confrontés à différentes barrières biologiques :

- Extracellulaires :
 - clairance rénale et reconnaissance par le système réticulo-endothélial
 - agrégation avec les protéines plasmatiques
 - accès au tissu cible
- Cellulaires :
 - Interaction avec la membrane cellulaire et internalisation
 - Echappement endosomal

La taille, la charge et la chimie de surface des nanovecteurs sont des paramètres importants pour obtenir une délivrance ciblée avec une quantité minimale de vecteurs⁽³⁹⁾.

3.3.3.1. Influence de la taille des nanovecteurs

La taille des nanovecteurs conditionne leur demi-vie et la biodistribution dans l'organisme. En effet, les particules inférieures à 25 nm sont rapidement filtrées par les glomérules rénaux. Les particules supérieures à 250 nm présentent un rayon de courbure favorisant la fixation des opsonines et donc la reconnaissance et la fixation par le système réticulo-endothélial. Ainsi, le choix de nanovecteurs de taille comprise entre 50 et 250 nm favorise le prolongement de leur circulation dans l'organisme par réduction de l'excrétion rénale et de l'opsonisation⁽³⁹⁾.

De plus, la taille joue un rôle dans l'accumulation des nanovecteurs dans certains tissus et leur internalisation cellulaire. Les nanoparticules de cet ordre de grandeur s'accumulent de manière passive dans les tissus ayant une perméabilité vasculaire élevée, tels que les tissus tumoraux et inflammatoires. Au niveau des tumeurs, cette accumulation est majorée par l'architecture irrégulière de l'endothélium vasculaire et le faible drainage lymphatique qui y réside. Ce phénomène, nommé effet EPR⁽⁸¹⁾ (« *Enhanced Permeability and Retention Effect* ») favorise le maintien des nanovecteurs au niveau des tumeurs. Son mécanisme sera détaillé dans la partie 3.4.1

La forme des nanovecteurs pourrait également interférer avec leur internalisation. Une forme sphérique semble plus adaptée qu'une forme allongée puisqu'elle risque moins d'encombrer les récepteurs voisins du site de liaison sur la membrane cellulaire⁽⁸²⁾.

3.3.3.2. Influence de la charge de surface

La charge des nanovecteurs conditionne l'interaction des siRNA avec les protéines biologiques de l'organisme (Figure 29). Une charge positive est nécessaire pour créer une liaison électrostatique avec les siRNA polyanioniques. En revanche, la charge de surface des nanovecteurs ne doit pas être trop prononcée. Une charge de surface très positive entraîne la formation d'agrégats avec les protéines plasmatiques chargées négativement (e.g l'albumine). Ces agrégats sont rapidement reconnus et éliminés par le système réticulo-endothélial. Une charge de surface très négative empêche quant à elle l'internalisation des nanovecteurs par répulsion de charge avec les membranes cellulaires, chargées négativement⁽³⁹⁾.

La charge de surface des nanovecteurs peut être évaluée par la mesure du potentiel zêta. Celui-ci mesure le potentiel entre la particule et la solution environnante. Le potentiel zêta est également utile pour évaluer le chargement des siRNA au sein des nanovecteurs ou le recouvrement des ceux-ci par le PEG⁽⁸⁰⁾.

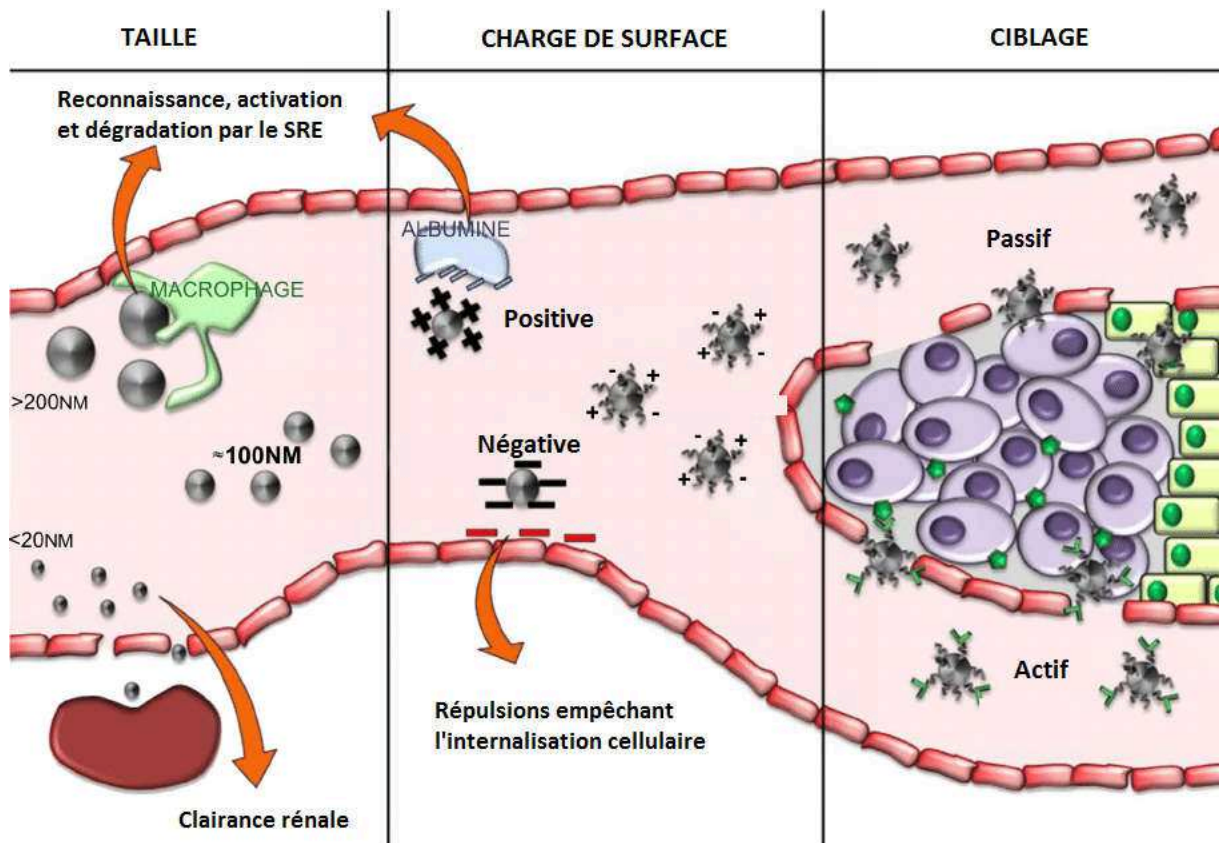


Figure 29 : facteurs influençant la biodistribution des nanovecteurs⁽³⁹⁾

3.3.4. Nanovecteurs de siRNA : avantages et inconvénients

Ces dernières années, de nombreux nanovecteurs ont été synthétisés dans le but d'acheminer les siRNA vers les cellules tumorales. Les matériaux qui composent ces nanovecteurs, basés sur des composés variés tels que les polymères, les lipides ou encore les nanoparticules magnétiques, conditionnent leurs propriétés intrinsèques. Quelle que soit

la composition du nanovecteur, celui-ci doit être capable de transporter les siRNA qu'il contient jusqu'aux cellules cibles et d'assurer ensuite leur libération. L'utilisation de molécules cationiques constitue la façon la plus simple de vectoriser les siRNA anioniques en induisant des interactions ioniques facilitant la libération des siRNA.

Des alternatives à l'intervention de liaisons ioniques existent, principalement par formation de ponts disulfures entre le siRNA et l'un des composants du nanovecteur. Ces liaisons sont rapidement clivées par action du glutathion intracytoplasmique afin de libérer les siRNA⁽⁸³⁾⁽⁸⁴⁾.

3.3.4.1. Polyplexes

Les polyplexes sont, avec les lipoplexes, les nanovecteurs de siRNA les plus étudiés actuellement. Ces sont des nanoparticules solides, biodégradables se présentant sous forme colloïdale⁽⁸⁵⁾. Ils sont composés de polymères cationiques qui se complexent par simple mélange et s'auto-assemblent. Leur synthèse et leur fonctionnalisation sont simples et peu coûteuses.

Les polyplexes peuvent être classifiés en deux catégories en fonction de l'origine de leurs composants :

- polymères synthétiques : PEI, dendrimères, ...
- polymères naturels : chitosane, cyclodextrines, atélocollagène, ...

3.3.4.1.1. Poly (éthylène imine)

Les poly (éthylène imine) ou PEI sont des polymères synthétiques hydrosolubles se présentant sous forme linéaire ou branchée (Figure 30). Leur structure, composée de

répétitions de groupements amines espacés par deux groupements methyl, confère aux nanovecteurs une forte densité de charge cationique⁽⁸⁰⁾.

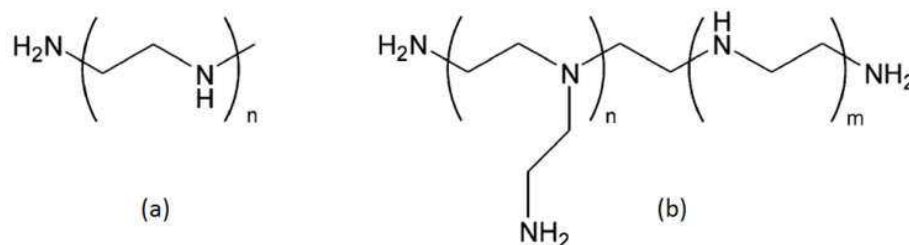


Figure 30 : Poly (éthylène imine) (a) forme linéaire (b) forme branchée

Les PEI ont d'abord été utilisés efficacement pour la délivrance d'ADN plasmidique. Néanmoins, leur rendement dans la vectorisation de siRNA est bien moindre. Ceci pourrait s'expliquer par la taille plus petite des siRNA, entraînant une plus faible liaison électrostatique entre le PEI cationique et le siRNA anionique. Les PEI sont également responsables de cytotoxicité par fixation à la membrane cellulaire et activation de l'apoptose⁽⁸⁵⁾. Cette toxicité peut être en partie contrôlée en limitant la taille des PEI, ainsi que les ramifications⁽⁸⁶⁾.

Malgré les effets indésirables qu'ils provoquent, les PEI sont souvent utilisés pour le transport de siRNA, en association avec d'autres composés car ils favorisent l'échappement endosomal des nanovecteurs⁽⁸⁷⁾. En effet, au cours de la maturation des endosomes, les PEI internalisés par endocytose voient leurs amines subir une protonation lors de la diminution du pH. Ceci entraîne un flux de protons, de chlore et d'eau vers la vésicule endosomale puis une rupture de la membrane endosomale par gonflement osmotique. Cet effet nommé « *proton sponge effect* » ou effet d'éponge à protons est

recherché pour faciliter la sortie endosomale des nanovecteurs et la libération des siRNA dans le cytoplasme⁽³⁹⁾.

3.3.4.1.2. Dendrimères

Le terme dendrimère vient du grec *dendron* qui signifie « arbre ». Les dendrimères sont des macromolécules synthétiques tridimensionnelles, régulières, sphériques et arborescentes (Figure 31). Leur structure, leur taille et leur charge de surface sont aisément réglables. Ils peuvent adsorber, encapsuler ou conjuguer des molécules favorisant ainsi leur fonctionnalisation⁽⁸⁷⁾.

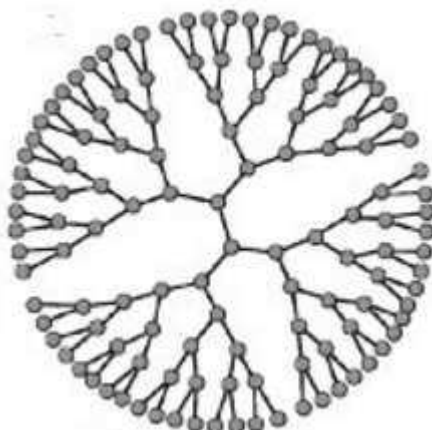


Figure 31 : Structure générale des dendrimères

Parmi les dendrimères cationiques récemment développés pour transporter des siRNA, les dendrimères de polyamidoamine (PAMAM) sont particulièrement intéressants de par la présence de groupements amines. Les dendrimères de PAMAM sont synthétisés pas à pas et chaque couche de ramifications représente une nouvelle génération⁽⁸⁸⁾. Cette approche permet de contrôler la taille de ces structures. De plus, il est possible de modifier les

amines tertiaires en amines quaternaires cationiques pour créer des interactions électrostatiques avec les siRNA et bloquer les amines terminales pour limiter la charge de surface⁽⁸⁹⁾. Enfin, comme pour le PEI, la présence d'amines protonables favorise l'échappement endosomal par l'effet d'éponge à protons.

Malgré les modifications, les dendrimères provoquent une cytotoxicité non spécifique, subissent une clairance rapide. La libération de siRNA à partir de ces systèmes semble limitée⁽⁶³⁾. De plus, leur capacité de chargement est faible. Ils sont donc utilisés préférentiellement en association⁽⁹⁰⁾.

3.3.4.1.3. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide cationique linéaire naturel extrait des crustacés (Figure 32). Il se forme par l'enchaînement aléatoire de N-acetyl-D-glucosamine et de D-glucosamine liés en $\beta(1-4)$ ⁽⁶³⁾. Leur utilisation comme vecteur est possible grâce à leur forte stabilité en solution et leur résistance aux nucléases endogènes⁽⁷⁷⁾. Il est biocompatible, non immunogène et biodégradable ce qui en fait un composé de choix pour la vectorisation de siRNA.

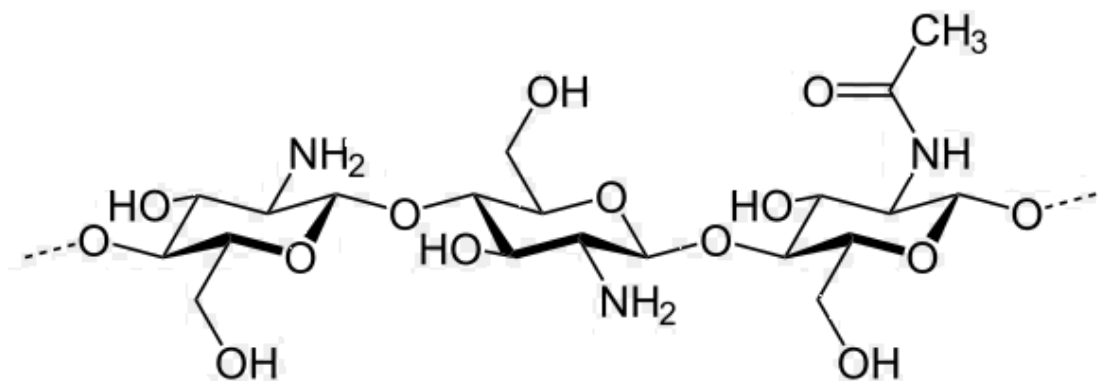


Figure 32 : Chitosane⁽⁸⁷⁾

Des modifications sont toutefois nécessaires pour augmenter la solubilité des polymères de chitosane en solution et favoriser leur échappement endosomal⁽⁸⁷⁾.

3.3.4.1.4. Cyclodextrines (CD)

Les cyclodextrines sont des macromolécules chimiquement et physiquement stables, hydrosolubles et biocompatibles, produites par la dégradation enzymatique de l'amidon. Ce sont des oligosaccharides naturels cycliques constitués de 6, 7 ou 8 unités de glucopyranose reliés en $\alpha(1-4)$, nommés respectivement α , β et γ cyclodextrines (Figure 33)⁽⁸⁷⁾. Leur forme ressemble à un cône tronqué ayant une surface hydrophile et une cavité interne hydrophobe⁽⁹¹⁾.

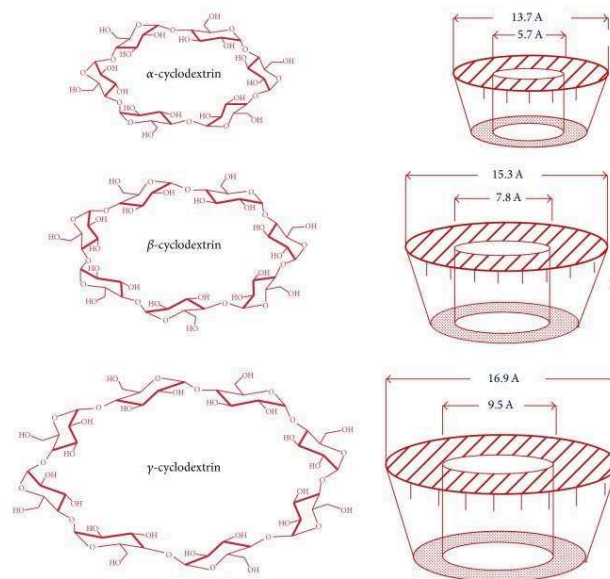


Figure 33: α , β et γ cyclodextrines⁽⁸⁷⁾

Les polymères contenant des cyclodextrines ont retenu l'attention des chercheurs pour la vectorisation de siRNA grâce à leur géométrie unique et leur faible immunogénicité. Néanmoins, le coût de production élevé, la solubilité limitée et le faible échappement endosomal de ces nanovecteurs nécessitent d'approfondir les données actuelles⁽⁶³⁾.

3.3.4.1.5. Atélocollagène

L'atélocollagène est un peptide de 30 kDa formant une hélice composée de trois chaînes polypeptidiques, obtenu à partir de collagène de type I issu du derme de veau (Figure 34). Ce collagène subit un traitement par la pepsine afin de cliver une séquence d'acides aminés immunogènes aux extrémités C- et N-terminales, nommées télépeptides (Figure 34)⁽⁹²⁾. L'atélocollagène résultant de ce traitement a une taille d'environ 300 nm pouvant être synthétisé sous de nombreuses formes. Il possède l'avantage d'être biocompatible, métabolisé par le même mécanisme que le collagène endogène, peu immunogène et de charge positive en condition physiologique, ce qui facilite les

interactions électrostatiques avec les siRNA chargés négativement⁽⁹³⁾. De plus, il est liquide à faible température et peut donc être facilement mélangé à une solution de siRNA.

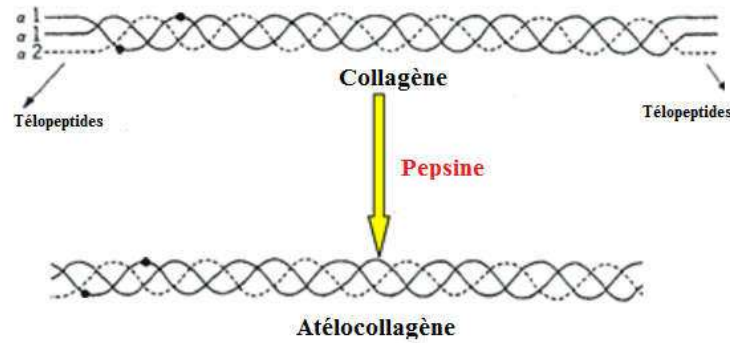


Figure 34 : obtention de l'atélocollagène⁽⁹⁴⁾

Une étude menée sur des souris porteuses de métastases hépatiques marquées a permis de montrer l'efficacité du collagène en tant que nanovecteur ainsi que l'efficacité anti tumorale de l'injection IV de siRNA anti-PLK-1 couplés à l'atélocollagène⁽⁹⁵⁾.

L'accumulation préférentielle de l'atélocollagène au niveau du foie favorise son utilisation dans le traitement de tumeurs hépatiques mais nécessite l'apport de molécules de ciblage pour d'autres localisations tumorales.

3.3.4.2. Lipoplexes et nanoparticules lipidiques

Les liposomes sont utilisés comme systèmes de délivrance depuis plus de 40 ans et ont été largement étudiés pour la vectorisation de molécules thérapeutiques. Ce sont des vésicules composées d'un compartiment aqueux enfermé dans une ou plusieurs bicouches lipidiques. Ils s'auto-assemblent en solution aqueuse grâce au caractère amphiphile des lipides, dotés d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe (Figure 35). Ceci permet

une grande capacité de fonctionnalisation sur la bicouche hydrophobe et la protection des siRNA hydrophiles dans le compartiment interne. De plus, leurs caractéristiques proches des membranes cellulaires favorisent l'internalisation des liposomes par fusion avec celles-ci, limitant le passage par la voie d'endocytose⁽⁷⁷⁾. Ils ont l'avantage d'être biocompatibles, faciles à synthétiser et à fonctionnaliser et peu coûteux à produire.

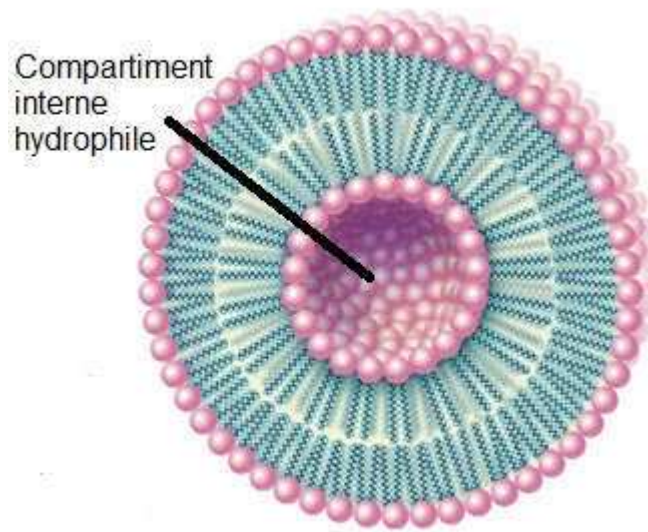


Figure 35 : Liposome

Les premiers liposomes utilisés pour transporter des siRNA furent les lipides cationiques. Leur charge positive crée des interactions électrostatiques avec les siRNA polyanioniques qui facilitent l'intégration des siRNA au sein de ces nanovecteurs nommés lipoplexes.

L'utilisation des lipides cationiques engendre :

- une toxicité dose-dépendante par formation de radicaux libres et par augmentation de la concentration calcique intracellulaire,
- une activation d'une réponse inflammatoire médiée par TLR4,
- une hépatotoxicité par reconnaissance rapide par les macrophages du système réticulo-endothélial et accumulation hépatique ⁽⁹⁶⁾.

Pour diminuer la toxicité des lipoplexes, des lipides neutres ont été développés. Ceux-ci incluent les phospholipides, tels que DOPE⁽⁹⁷⁾ ou DOPC, et les lipides pegylés ⁽⁹⁶⁾. Ces lipides neutres sont moins toxiques mais aussi moins efficaces pour transporter les siRNA car ils limitent les interactions avec la membrane cellulaire⁽⁸²⁾. En revanche, certains lipides neutres, dont DOPE(Figure 36), ont la capacité de déstabiliser les membranes. Tandis que les lipides classiques s'associent aux membranes sans les modifier, DOPE forme une structure hexagonale lorsqu'il fusionne avec les membranes. Lorsque ces lipides, dits « lipides fusogéniques », fusionnent avec la membrane endosomale, ils facilitent l'échappement endosomal de leur contenu, à savoir les siRNA⁽³⁹⁾. Ces lipides fusogéniques sont donc classiquement intégrés dans de nombreuses formulations pour promouvoir la libération des siRNA dans le cytoplasme.

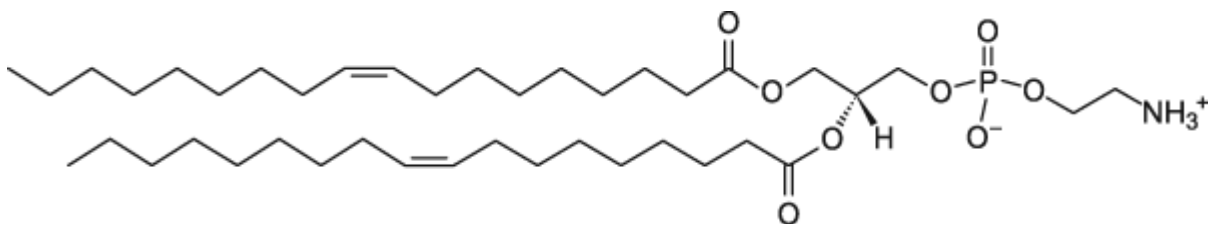


Figure 36 : DOPE

Ainsi, la synthèse de systèmes de délivrance lipidiques nécessite de trouver le bon compromis dans la répartition des lipides cationiques et neutres afin de limiter la toxicité sans altérer l'efficacité des lipoplexes. L'utilisation de lipides conjugués à des polymères de PEG par une liaison sensible au pH (exemple : PEG-diortho ester-lipides⁽⁹⁸⁾) permet d'enlever la couche de PEG après l'endocytose, et donc d'augmenter l'échappement endosomal.

Une méthode récente de synthèse de nanoparticules lipidiques, les SNALP (« *Stable Nucleic Acid Lipid Particle* », Figure 37) a été décrite. Ces SNALP ont l'avantage d'être stables dans le sérum et peu toxiques tout en gardant une grande efficacité de vectorisation⁽⁹⁶⁾. Leur synthèse débute par la formation d'un lipoplexe par complexation de siRNA dans des liposomes formés par des lipides cationiques. Ces lipoplexes sont ensuite recouverts par des « *lipid helper* » jouant un rôle dans l'échappement endosomal (lipides fusogéniques) et des lipides pegylés espacés par des molécules de cholestérol comblant les lacunes entre les différents lipides⁽⁹⁷⁾.

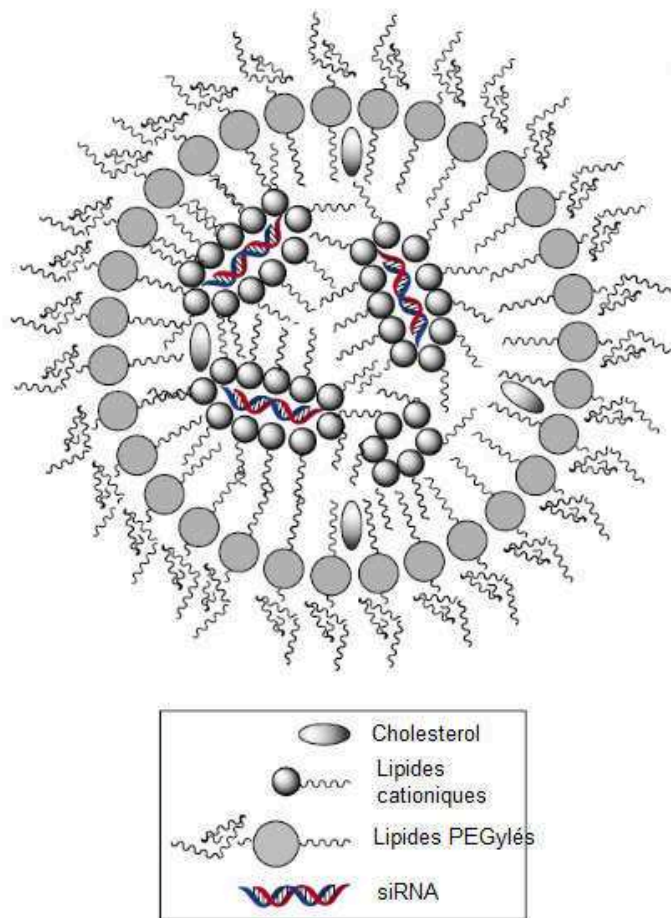


Figure 37 : SNALP

De par leur accumulation naturelle dans le foie, les lipoplexes et les nanoparticules lipidiques sont des vecteurs de choix pour la vectorisation de siRNA dans le traitement de cancers hépatiques. Le ciblage d'autres organes par ces vecteurs lipidiques est cependant plus difficile à obtenir.

3.3.4.3. Nanoparticules métalliques

De nombreux métaux ont été utilisés pour développer de nouveaux nanovecteurs de siRNA. Parmi eux, les nanoparticules magnétiques (MNP) et les nanoparticules d'Or

(AuNP) représentent les deux types de nanovecteurs métalliques les plus prometteurs dans la délivrance de siRNA.

3.3.4.3.1. Nanoparticules magnétiques (MNP)

Les nanoparticules magnétiques, initialement formulées comme agents de contraste en imagerie médicale, présentent des caractéristiques innovantes dans le ciblage de tumeurs solides. Ces MNP, principalement les « *Iron Oxyde Nanoparticles* » (IONP), peuvent être intégrées dans la plupart des nanovecteurs polymériques et lipidiques pour leur conférer de nouvelles propriétés (Figure 38). En effet, il est possible de visualiser par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) le trajet des MNP après l'administration dans l'organisme et suivre l'évolution des tumeurs. Ces nanovecteurs capables d'associer des propriétés thérapeutiques et diagnostiques ont donné naissance au concept de « théranostique », qui pourrait représenter une approche médicale innovante dans les années à venir.

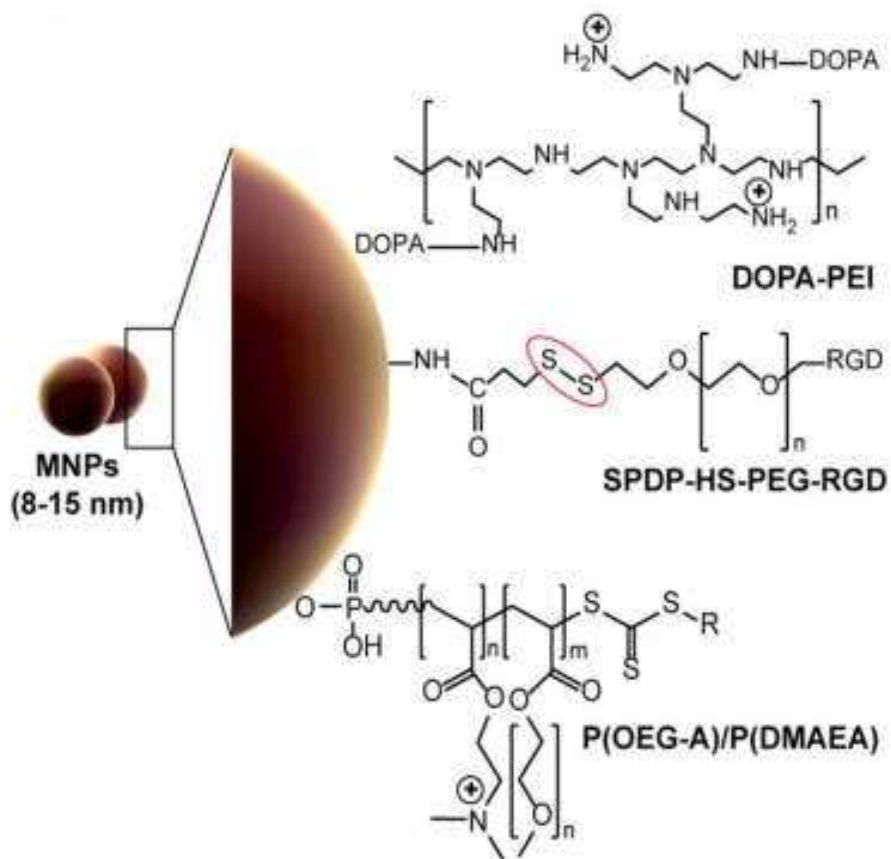


Figure 38 : structure des MNP et exemples de fonctionnalisation⁽⁶³⁾

Mahajan et al⁽⁹⁹⁾ ont développé un vecteur d'environ 120 nm composé d'une nanoparticule magnétique de type SPION (« *SuperParamagnetic Iron Oxyde Nanoparticle* ») couplée à du dextrane pour transporter des siRNA anti-PLK1. L'injection de ces nanoparticules chez des souris porteuses de tumeurs pancréatiques a permis non seulement de réduire le volume des tumeurs mais aussi de suivre la biodistribution des siRNA. En effet, l'accumulation des nanovecteurs au sein de la tumeur pancréatique est observable 6H post-injection grâce à la présence des nanoparticules magnétiques qui diminuent le contraste à l'IRM (Figure 39).

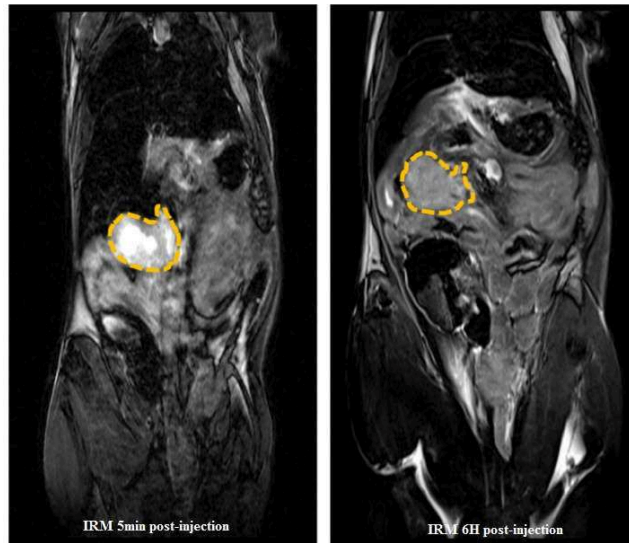


Figure 39 : IRM d'une souris 5 min et 6H après injection de siPLK1-SPION⁽⁹⁹⁾

En parallèle de leurs propriétés en imagerie, les MNP permettent également un ciblage actif des tumeurs solides par application d'un champ magnétique externe entraînant la rétention et la délivrance ciblée des siRNA au niveau tumoral (Figure 40).

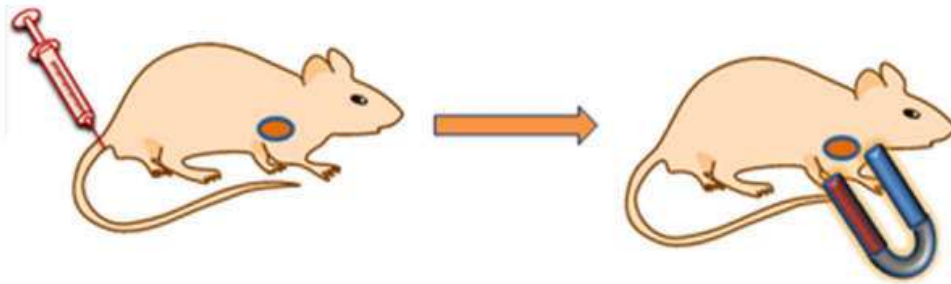


Figure 40 : Application d'un champ magnétique externe après injection de nanovecteurs magnétiques chez la souris⁽¹⁰⁰⁾

Yang et al⁽¹⁰⁰⁾ ont construit un nanovecteur à base d'oxyde de fer (Fe_3O_4) associé à un lipide thermosensible pour transporter des siRNA anti-cMyc. Dans cette étude, les chercheurs ont combiné les propriétés magnétiques de l'oxyde de fer et thermosensibles

des lipides utilisés afin d'assurer une délivrance ciblée des siRNA. Chez des souris porteuses de tumeurs, l'application d'un champ magnétique externe localement a permis d'obtenir une accumulation significative de nanovecteurs au niveau tumoral. De plus, l'oxyde de fer soumis à un champ magnétique externe s'échauffe et facilite le relargage des siRNA par dénaturation des lipides thermosensibles au sein du nanovecteur entraînant une activité accrue au niveau tumoral (Figure 41).

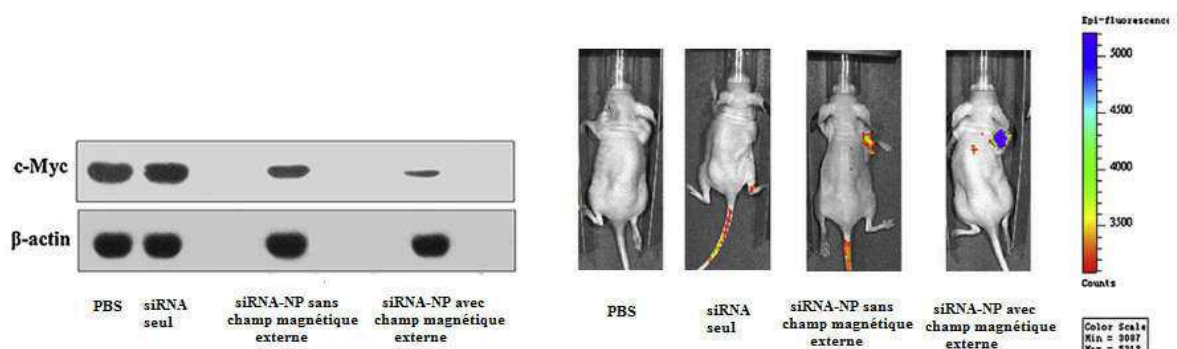


Figure 41 : expression intratumorale de l'ARNm cMyc et biodistribution des siRNA 12H post-administration⁽¹⁰⁰⁾

Malgré ces caractéristiques prometteuses, les nanoparticules magnétiques nécessitent une étude approfondie avant d'être utilisées en cancérologie car elles sont peu biocompatibles, non biodégradables et possèdent une stabilité colloïdale limitée.

3.3.4.3.2. Nanoparticules d'or (AuNP)

Les nanoparticules d'or sont des particules intéressantes car faciles à préparer, biocompatibles et relativement stables (Figure 42).

Les siRNA peuvent être⁽⁶³⁾ :

- directement conjugués à leur surface *via* des interactions électrostatiques entre l'AuNP cationique et le siRNA anionique ou par des liaisons thiols clivables en milieu acide,
- adhérents à la surface de l'AuNP préalablement recouverte d'une couche de polymères.

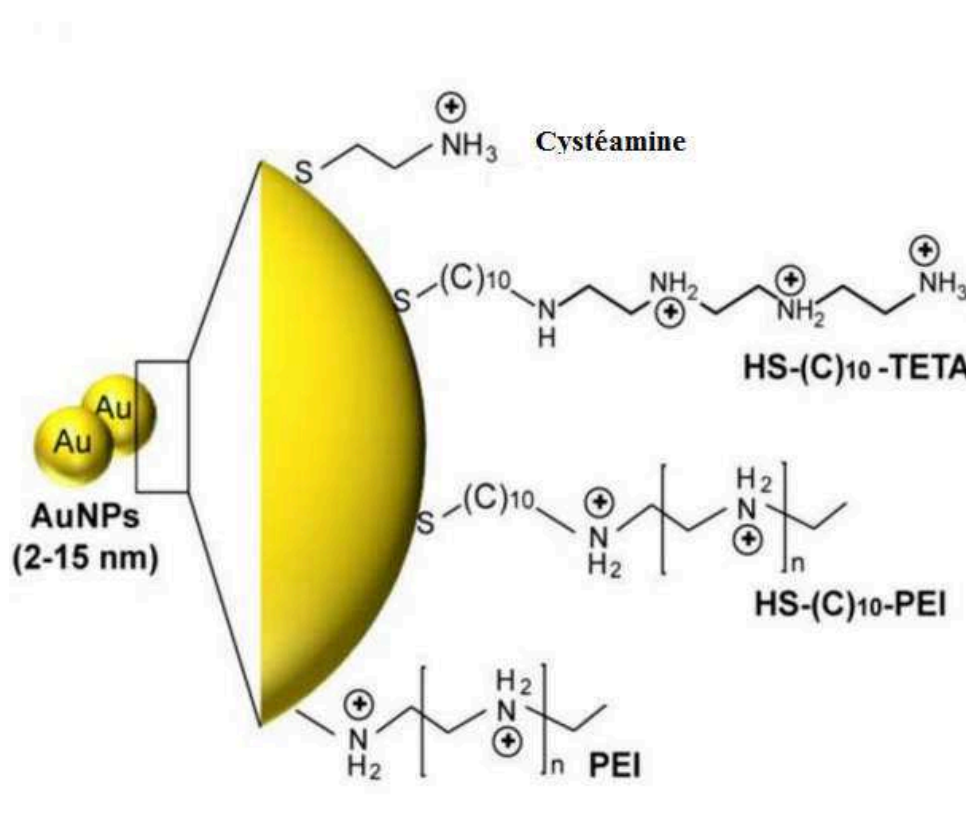


Figure 42 : structure et exemples de nanoparticules d'or⁽⁶³⁾

Une étude de vectorisation de siRNA anti-TGF- β 1 par des nanoparticules d'or a montré des résultats intéressants dans le traitement de tumeurs hépatiques chez la souris. Ces nanoparticules fonctionnalisées par des groupements cystéamine, formant une liaison thiol avec les siRNA, ont permis d'augmenter la durée de vie des souris traitées par rapport au groupe contrôle⁽¹⁰¹⁾.

Néanmoins, le coût élevé des nanoparticules d'or et leur accumulation dans l'organisme par absence de biodégradabilité limitent leur utilisation à grande échelle actuellement.

3.3.4.4. Les nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN)

Les nanoparticules de silice mésoporeuse sont des vecteurs inorganiques formés par la réaction de tetraethyl orthosilicate dans un milieu micellaire⁽⁸⁸⁾. Les MSN ont une structure mésoporeuse stable unique composée de pores de taille variable et réglable, leur conférant une grande surface pouvant être fonctionnalisée pour permettre le transport ciblé d'une grande quantité de siRNA (Figure 43). De plus, ces nanovecteurs sont biocompatibles, biodégradables et de synthèse facile. De nombreuses MSN transportant des siRNA ont été étudiées dans le traitement de cancers ces dernières années montrant une activité intéressante⁽¹⁰²⁾⁽¹⁰³⁾.

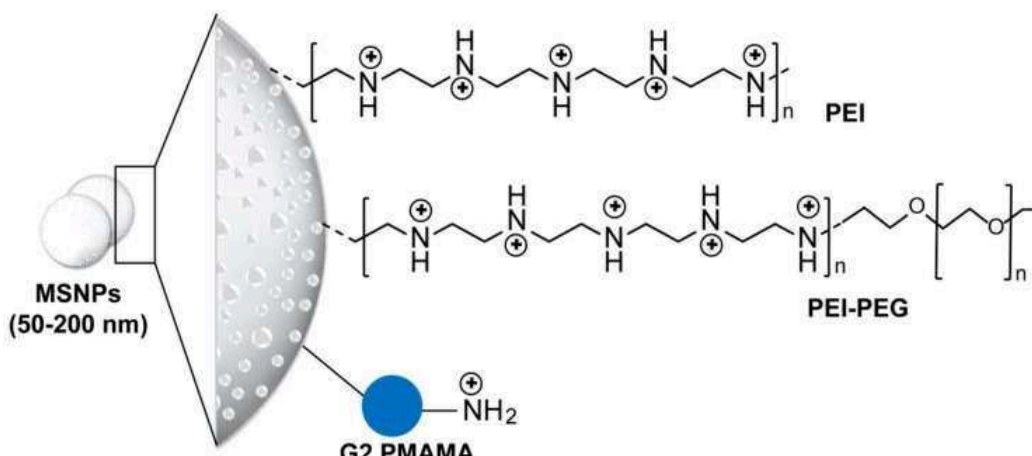


Figure 43 : structure des MSN sphériques et exemples de fonctionnalisation(63)

Enfin, la présence de multiples pores permet également d'intégrer au sein d'un même nanovecteur de MSN des siRNA avec des molécules de chimiothérapie. Il est ainsi possible par exemple d'améliorer l'effet de la Doxorubicine par co-administration de siRNA anti-bcl-2⁽¹⁰⁴⁾.

Une autre étude dans un modèle murin de cancer du sein résistant à la Doxorubicine, basée sur l'utilisation de nanoparticules de silice mésoporeuse sphériques fonctionnalisées par des groupements de copolymères PEI-PEG a permis d'administrer de façon concomitante la Doxorubicine et des siRNA anti-Pgp en entraînant un effet synergique comparé à l'administration de Doxorubicine seule ou de siRNA seuls dans ces mêmes nanovecteurs. De plus, l'encapsulation de la Doxorubicine entraîne une diminution de sa toxicité cardiaque⁽¹⁰⁵⁾.

Les caractéristiques uniques des MSN en font un vecteur de choix dans le transport de siRNA, leur toxicité lors de l'administration *in vivo* ainsi que leur taille très supérieure à 100 nm après fonctionnalisation limitent actuellement l'utilisation de ces vecteurs.

3.3.4.5. Nanotubes de carbone (CNT) et oxydes de graphène (GO)

Les nanotubes de carbone sont des nanostructures unidimensionnelles ressemblant à une nanoaiguille de 1 à 2 nm de diamètre et pouvant aller jusqu'à 1cm de longueur (Figure 44). Ils peuvent se composer d'une seule paroi (« *Singlewalled Carbon Nanotubes* ») ou de plusieurs (« *Multiwalled Carbon Nanotubes* »). Ils nécessitent une fonctionnalisation par liaisons covalentes ou non covalentes avec des groupements ammonium de polymères (PEI⁽¹⁰⁶⁾, PAMAM⁽¹⁰⁷⁾,...) pour atténuer leur hydrophobicité et permettre une interaction avec les siRNA hydrophiles. Leur structure permet une grande capacité de fonctionnalisation grâce à une grande aire de surface où chaque atome est exposé à la surface du nanovecteur⁽⁶³⁾.

Récemment, des particules d'Oxyde de Graphène (GO) ont été synthétisées pour la vectorisation de siRNA. Ces nanostructures bidimensionnelles en forme de feuilles offrent, de par leur grande surface, une capacité de fonctionnalisation et de chargement de siRNA prometteuses⁽¹⁰⁸⁾.

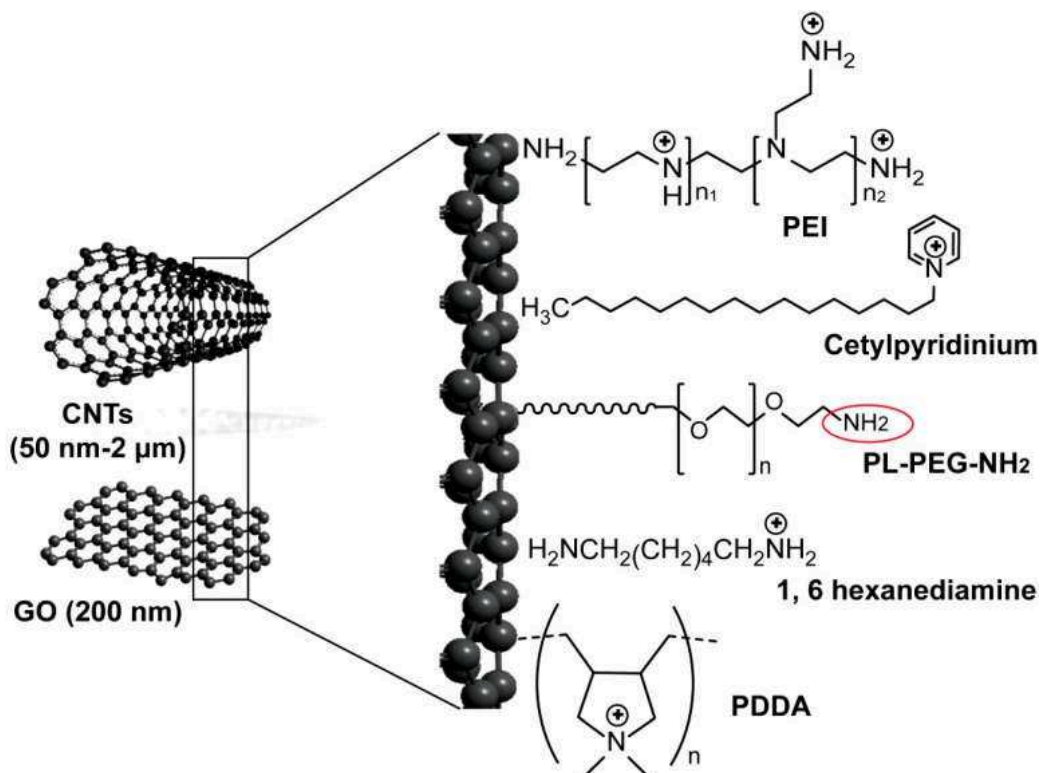


Figure 44 : structure des CNT et GO et exemples de fonctionnalisation⁽⁶³⁾

Malgré ces caractéristiques intéressantes, les nanotubes de carbone sont difficilement utilisables actuellement car non biodégradables. Ainsi, ils s'accumulent au niveau des organes et sont responsables de cytotoxicité⁽⁶³⁾.

3.3.4.6. Quantum Dots (QDs)

Les Quantum Dots (Figure 45) sont des nanocristaux composés généralement d'un cœur semi-conducteur (CdSe, InP, PbSe, ...) enfermé dans une coquille de sulfure de zinc (ZnS). Leur taille et leur structure sont réglables et ils permettent un usage en théranostique grâce à leurs propriétés optiques uniques. La formation d'un revêtement à base de polymères augmente la biocompatibilité et la stabilité structurale de ces vecteurs qui subissent rapidement une oxydation de surface et une libération d'ions métalliques toxiques dans l'organisme⁽¹⁰⁹⁾⁽¹¹⁰⁾.

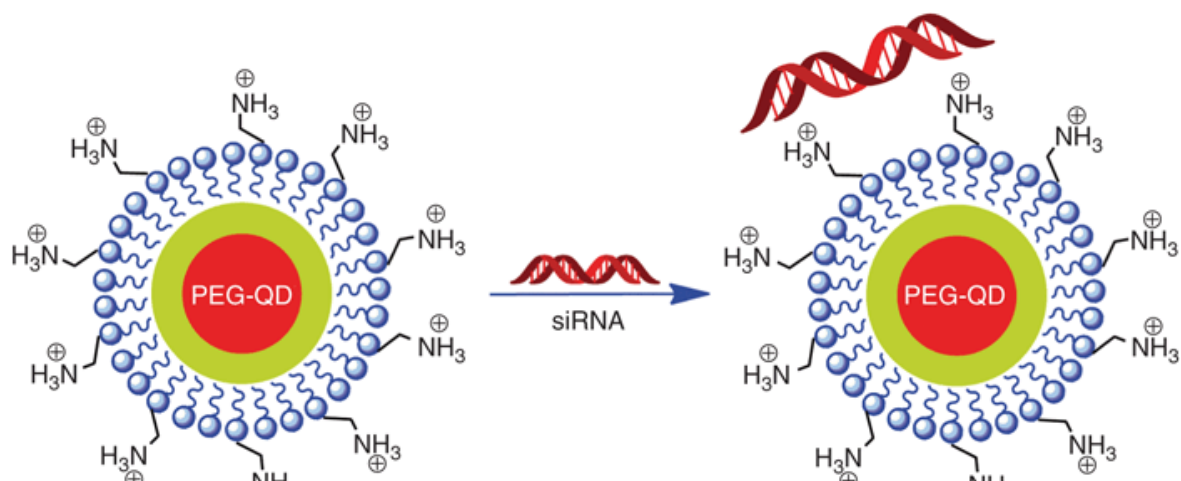


Figure 45 : structure des QDs et exemple de fonctionnalisation⁽¹¹⁰⁾

Malgré la possibilité de modifier leur surface pour les rendre temporairement biocompatibles, les Quantum Dots restent néanmoins très toxiques par la présence de métaux lourds s'accumulant dans l'organisme.

3.4. Ciblage tumoral

3.4.1. Ciblage passif

Le ciblage passif des nanovecteurs vers les tumeurs solides est possible grâce à l'effet EPR (« Enhanced Permeability and Retention Effect »). Ce phénomène, décrit par Maeda⁽¹¹¹⁾, est dû aux caractéristiques anatomiques et physiologiques des tumeurs solides. Contrairement aux tissus sains, les tissus cancéreux présentent un système vasculaire très développé pour augmenter l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance tumorale. Cette angiogénèse rapide, apparaît dès que la tumeur dépasse les 0,2 mm. Elle induit des irrégularités dans l'architecture de l'endothélium vasculaire, notamment par production excessive de médiateurs vasculaires tels que le VEGF, la bradykinine, de

monoxyde d'azote et le monoxyde de carbone⁽¹¹²⁾. Ainsi, les parois vasculaires présentent une structure pauvre et désorganisée. L'absence de cellules musculaires lisses et la formation des fenestrations entre les cellules endothéliales pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres favorisent la pénétration des nanovecteurs dans les tissus tumoraux.

De plus, le drainage lymphatique de ces tissus est fortement limité car l'augmentation rapide de la taille des tumeurs entraîne un collapsus par compression des vaisseaux lymphatiques préexistants.

La porosité des vaisseaux sanguins tumoraux associée à un faible drainage lymphatique dans ces tissus mène à une accumulation naturelle et une rétention de longue durée des nanovecteurs au niveau des tumeurs solides.

3.4.2. Ciblage actif

Même si l'effet EPR permet un ciblage passif des tissus tumoraux, l'accumulation des nanovecteurs par ce biais n'est pas sélective car elle peut également intervenir dans les tissus inflammatoires.

Il est alors nécessaire de faciliter le ciblage des tumeurs par des molécules de reconnaissance dans le but de minimiser la délivrance non spécifique aux tissus sains et de limiter la dose administrée. Les récepteurs ou antigènes surexprimés à la surface des cellules tumorales sont des cibles préférentielles. La conjugaison des molécules peut se faire soit par liaison directe sur les siRNA ou sur les nanovecteurs.

3.4.2.1. Acide folique

L'acide folique (Figure 46), ou vitamine B₉, est une molécule stable et non immunogène indispensable pour le développement et la croissance cellulaire ⁽⁷³⁾. La vitamine B₉, sous sa forme active folate hydrophile, a une faible activité pour les transporteurs du folate couplés aux protons et pour les transporteurs du folate réduit exprimés dans la plupart des cellules. En revanche, elle possède une grande affinité pour les deux isoformes α et β de récepteurs à l'acide folique surexprimés dans les tumeurs ovariennes, rénales ou cérébrales et peu dans les tissus sains⁽¹¹³⁾.

La fonctionnalisation des nanovecteurs ou des siRNA par l'acide folique facilite donc le ciblage tumoral et l'internalisation du complexe dans les cellules par endocytose.

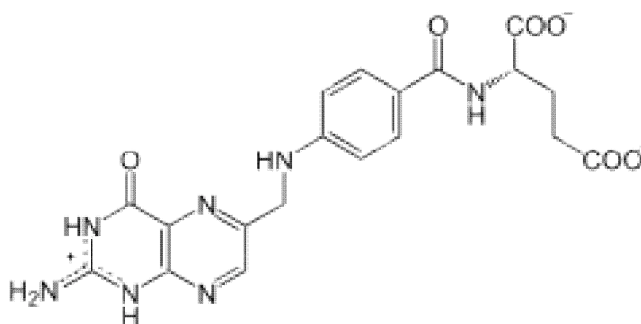


Figure 46 : Folate

Dohmen et Fröhlich ont synthétisé un siRNA conjugué au niveau de l'extrémité 5' du brin sens par des unités 1,2 diamino-éthane reliées par un pont disulfure à du folate-PEG. La présence de folate a conduit à une augmentation de l'internalisation cellulaire et de l'inhibition génique *in vitro* par rapport au siRNA seul ou PEGylé⁽¹¹⁴⁾. La conjugaison à l'extrémité 5' du brin sens n'a de plus pas modifié l'activité du siRNA.

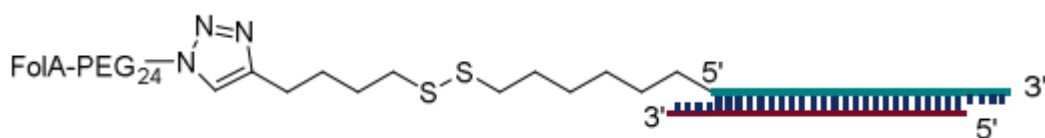


Figure 47 : siRNA conjugué à du folate-PEG⁽¹¹⁴⁾

L'équipe de Li et Wang⁽¹¹⁵⁾ a conçu un nanovecteur de siRNA anti-VEGF à base de 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine-PEI (HP- β -CD-PEI) fonctionnalisé par de l'acide folique (FA). La taille de la tumeur et le niveau d'expression du VEGF ont été comparés après injection de siRNA anti-VEGF/HP- β -CD-PEI, de siRNA anti-VEGF/FA-HP- β -CD-PEI et de siRNA non spécifiques du VEGF/FA-HP- β -CD-PEI afin d'évaluer l'efficacité du ciblage par l'acide folique. Leurs résultats ont montré que les nanovecteurs fonctionnalisés par de l'acide folique intégrant des siRNA anti-VEGF entraînent une diminution plus importante de la taille des tumeurs ainsi qu'une plus forte diminution de l'expression du VEGF, démontrant ainsi l'intérêt de l'utilisation de l'acide folique pour cibler les tumeurs (Figure 48).

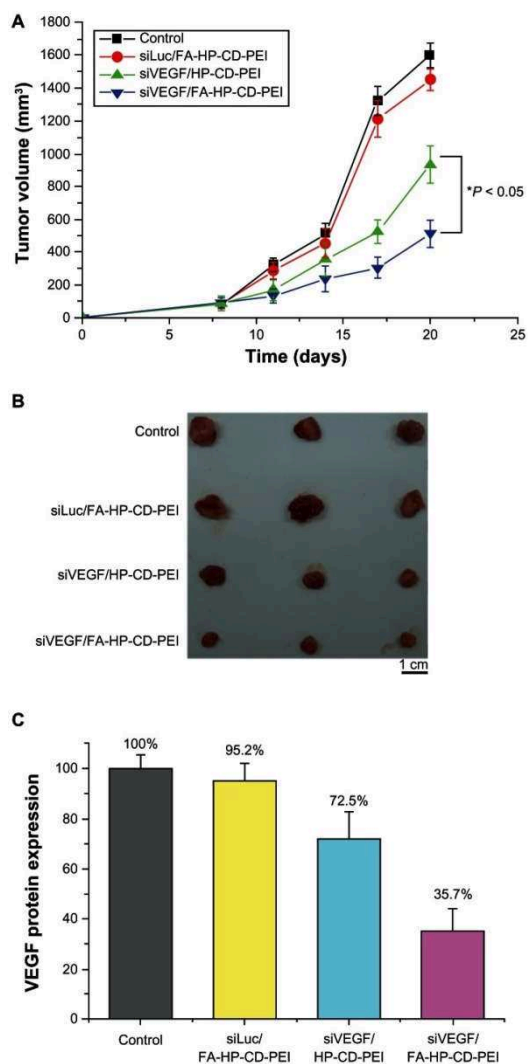


Figure 48 : (A) Evolution de la taille tumorale en fonction du temps après injection, (B) taille de la tumeur après injection (C) niveau d'expression du VEGF au sein de la tumeur⁽¹¹⁵⁾

3.4.2.2. Transferrine

Le récepteur à la transferrine est présent à la surface des cellules pour permettre le passage du fer lié à la transferrine. L'expression de ce récepteur étant liée aux besoins en fer des cellules, il est fortement exprimé dans celles de la moelle osseuse mais également au niveau des cellules tumorales car le fer est nécessaire à leur progression⁽⁷³⁾.

Grabowska et al ont préparé un nanovecteur à base de PEI linéaire conjuguée à la transferrine pour délivrer *in vivo* des siRNA. L'administration intra péritonéale de ces complexes a montré une activité des siRNA plus marquée au niveau tumoral lorsqu'ils sont conjugués à la transferrine⁽¹¹⁶⁾.

3.4.2.3. Anticorps et aptamères

La spécificité des anticorps en fait des molécules de choix pour le ciblage de récepteurs exprimés à la surface des cellules tumorales. Néanmoins, leur poids moléculaire (environ 150kDa) freine leur progression au sein des tissus. Pour limiter ce problème, il est possible d'incorporer uniquement le fragment variable (scFv) ciblant le récepteur d'intérêt⁽⁶⁴⁾.

Cette technique est cependant potentiellement immunogène. L'utilisation d'aptamères, de petits acides nucléiques simples brins se fixant spécifiquement aux antigènes cellulaires, représente une alternative protéique aux anticorps. Ils ont l'avantage d'être de plus petite taille (environ 15kDa) moins immunogènes et moins coûteux à produire que les anticorps⁽⁷³⁾.

3.4.2.4. Petits peptides

Les petits peptides utilisés dans la fonctionnalisation des nanovecteurs sont composés de peptides de taille inférieure à 30 acides aminés ou de poids moléculaire inférieur à 3500 kDa. Ils ciblent spécifiquement et avec une grande affinité leurs récepteurs cellulaires, sont simples à préparer et permettent un accès rapide aux tissus⁽⁷³⁾.

Le motif Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) est commun à de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire reconnaissant des molécules de liaison du cytosquelette à la

matrice extracellulaire : les intégrines⁽³⁹⁾. Ces récepteurs d'adhésion cellulaire sont surexprimés à la surface des cellules tumorales car ils participent à l'ancrage local des tumeurs et l'internalisation de substances par endocytose⁽¹¹⁷⁾.

La liaison de peptides RGD à la surface des nanovecteurs permet de cibler les intégrines $\alpha\beta3$ surexprimées dans l'épithélium vasculaire et les cellules tumorales. Dans un premier temps, les peptides RGD ont été synthétisés sous forme linéaire et liés à la surface des nanovecteurs de siRNA⁽¹¹⁸⁾. Bien que ces peptides ciblent efficacement les tumeurs, ils sont rapidement dégradés par réaction au niveau du groupement Aspartate. Pour limiter ce problème, des peptides RGD cycliques ont été développés, ayant la même affinité que les peptides RGD linéaires pour les intégrines $\alpha\beta3$ et une meilleure résistance à la dégradation (Figure 49).

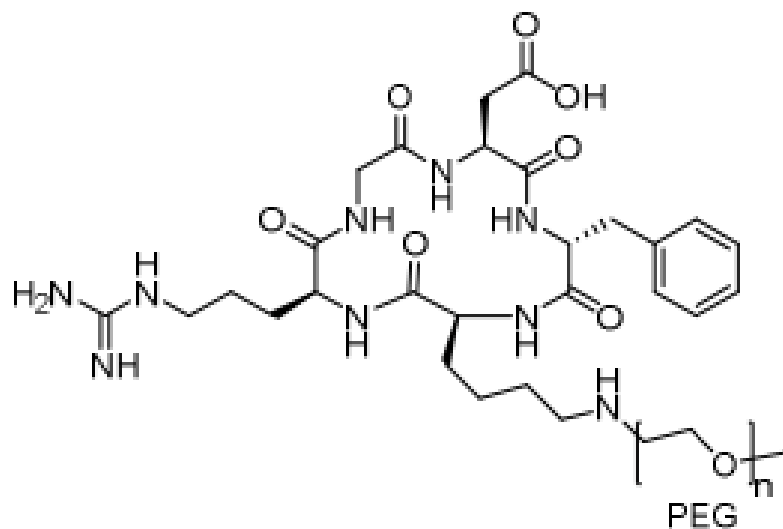


Figure 49 : peptide RGD cyclique - PEG

Kong et son équipe⁽¹¹⁹⁾ ont développé un nanovecteur à base de dendrimère de PAMAM de 5^e génération fonctionnalisé par des peptides RGD *via* des chaînes de PEG et

intégrant des nanoparticules d'or (Dendrimer-Entrapped Au-Nanoparticles, Au DENPs) afin de transporter des siRNA anti-VEGF ou anti-Bcl-2. L'expression des protéines VEGF et Bcl-2 a été mesurée après injection systémique de siRNA seuls, de Au-DENPs/siRNA et de Au-DENPs-RGD/siRNA. Il a été constaté une diminution plus importante de l'expression des deux protéines lors du transport de siRNA au sein de nanovecteurs fonctionnalisés par le peptide RGD, montrant ainsi la capacité de ciblage tumoral des peptides RGD (Figure 50).

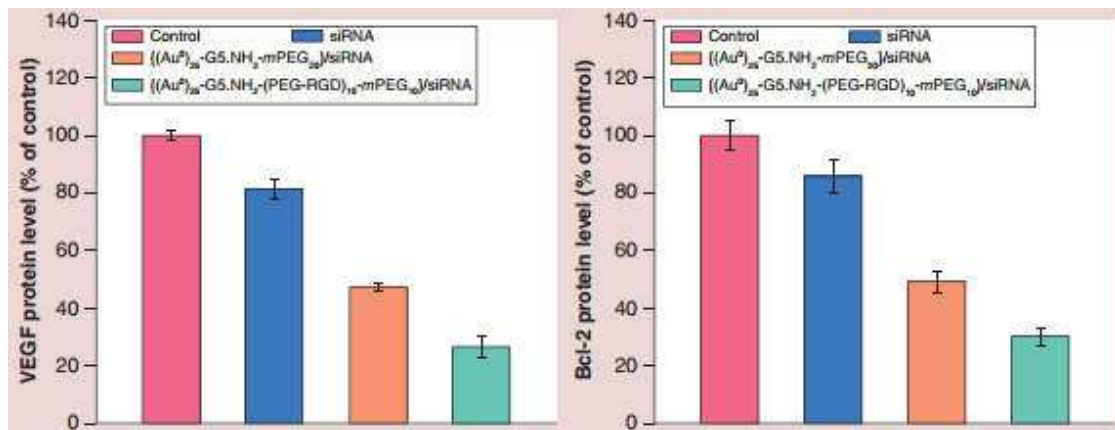


Figure 50 : Niveau d'expression de VEGF et Bcl-2 après injection de siRNA seul, Au-DENPs/siRNA et Au-DENPs-RGD/siRNA⁽¹¹⁹⁾

D'autres petits peptides de ciblage ont vu le jour. Parmi ceux-ci les peptides NGR (Asparagine-Glycine-Arginine) et APRPG (Alanine-Proline-Arginine-Proline-Glycine) ont montré des résultats intéressants pour l'accumulation de nanovecteurs au niveau des cellules endothéliales angiogéniques⁽⁷³⁾.

4. Essais cliniques

La découverte des mécanismes impliqués dans l'ARN interférence et des cibles potentielles en cancérologie ont conduit ces dix dernières années à la publication d'un nombre important de publications *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux pour décrire des méthodes de délivrance de siRNA. Ces nombreuses recherches ont abouti au développement d'essais cliniques chez l'Homme. Ainsi, le site www.clinicaltrials.gov⁽¹²⁰⁾ recense une vingtaine d'essais cliniques utilisant des siRNA en cancérologie dont 7 utilisent des vecteurs non viraux (Tableau 3).

Tableau 3 : Principaux essais cliniques utilisant des siRNA transportés par des nanovecteurs non viraux pour le traitement de tumeurs⁽¹²⁰⁾

Agent thérapeutique	Compagnie	Cible	Vecteur	Phase de l'essai
CALAA-01	Calando Pharmaceuticals [®]	RRM2	Cyclodextrine	Phase I terminée
Atu027	Silence Therapeutics [®]	PKN3	Nanoparticule lipidique	Phase I et Ib/IIa terminées
TKM-PLK1	Tekmira Pharmaceuticals [®]	PLK-1	Nanoparticule lipidique	Phase I terminée
ALN-VSP	Alnylam Pharmaceuticals [®]	VEGFA et KSP	Nanoparticule lipidique	Phase I terminée
siG12D LODER	Silenseed [®]	KRAS	Matrice polymérique (inj. locale)	Phase I terminée Phase II en cours
DCR-MYC	Dicerna Pharmaceuticals [®]	MYC	Nanoparticule lipidique	Phase I/II en cours
siRNA-EPHA2-DOPC	M.D Anderson Cancer Center [®]	EPHA2	Nanoparticule lipidique	Phase I en cours

Quatre essais cliniques basés sur l'utilisation de siRNA en oncologie ont à l'heure actuelle clôturé la phase I : CALAA-01, Atu027, TKM-PLK1 et ALN-VSP. Ces quatre études ont été menées par administration systémique de siRNA transportés par des nanovecteurs.

4.1. CALAA-01

CALAA-01, synthétisé par Calando Pharmaceuticals[®], a été le premier agent de délivrance systémique ciblée de siRNA à être évalué chez l'Homme dans le traitement de tumeurs solides⁽¹²¹⁾. Ce système est composé d'un nanovecteur polymérique à base de cyclodextrines couplées à un polymère hydrophile, l'adamantane-PEG, fonctionnalisé par la liaison de protéines de transferrine (Figure 51). Il permet la vectorisation de siRNA anti-RRM2 (Ribonucleotide Reductase M2) une enzyme impliquée dans le métabolisme des acides nucléiques surexprimée dans de nombreux cancers et dont l'inhibition conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

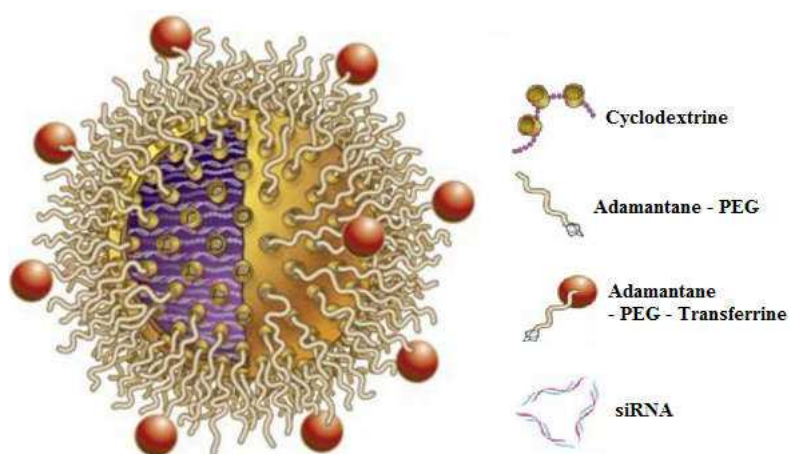


Figure 51 : Structure et composition de CALAA-01⁽¹²²⁾

L'essai clinique de Phase I avait pour objectifs de déterminer la dose maximale tolérée et d'étudier la réponse à une injection deux fois par semaine chez des patients atteints de tumeurs solides à un stade avancé⁽¹²³⁾. Des biopsies pré et post-traitement (18, 24 et 30mg siRNA/m²) chez des patients atteints de mélanomes ont permis d'observer l'accumulation de CALAA-01 au niveau de la tumeur ainsi que l'inhibition de l'expression de l'ARNm de RRM2 dose-dépendante (Figure 52). De plus, l'analyse par 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) a confirmé le clivage de l'ARNm de RRM2 induit par le siRNA de CALAA-01 à 24 et 30mg de siRNA/m² (Figure 53). Aucune réponse positive au traitement n'a été observée, mais un patient atteint de mélanomes métastasés a obtenu une stabilisation de la maladie après 4 mois à la dose de 30 mg de siRNA/m².

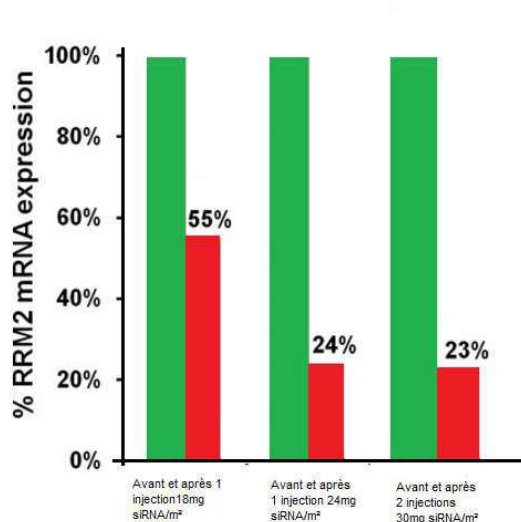


Figure 52 : Expression de l'ARNm de RRM2 pré et post-traitement par CALAA-01⁽¹²⁴⁾

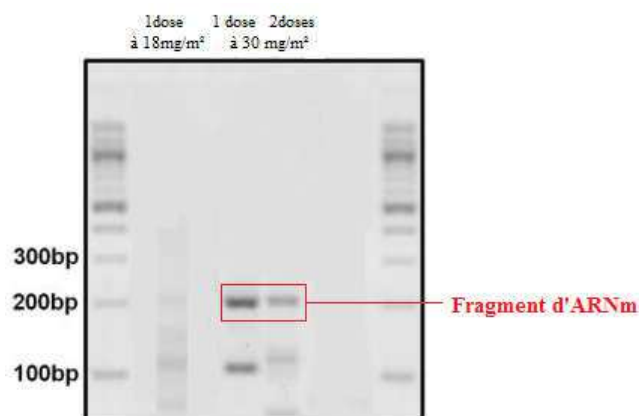


Figure 53 : 5'RACE montrant le clivage de l'ARNm de RRM2⁽¹²⁴⁾

Malgré ces résultats encourageants, la survenue d'effets indésirables sévères (asthénie, syndrome pseudo-grippal, nausées ...) ont conduit à l'arrêt de l'essai clinique avant son

terme. Aucune corrélation entre la dose de siRNA administrée ou la production de cytokines et l'apparition d'effets indésirables n'a été décelée. Les effets indésirables pourraient être dus au vecteur et plus particulièrement à une instabilité de la transferrine dans le temps⁽¹²⁴⁾.

4.2. Atu027

Silence Therapeutics[®] a conçu un nanovecteur lipidique nommé Atu027, composé de lipides cationiques (AtuFECT01), de lipides neutres (DPhyPE) et de lipides PEGylés (DSPE-PEG), afin de transporter des siRNA anti-PKN3 (Figure 54). L'inhibition de PKN3 semble stabiliser l'intégrité des vaisseaux sanguins et atténue la réponse inflammatoire par modulation de l'actine et augmentation de l'expression des VE-cadhérines. Atu027 pourrait ainsi réduire la perméabilité vasculaire tumorale et diminuer l'extravasation des cellules métastatiques⁽¹²⁵⁾. L'analyse préclinique chez *Cynomolgus monkeys* par 5'RACE a confirmé le mode d'action d'Atu027 en montrant un clivage de l'ARNm de PKN3.

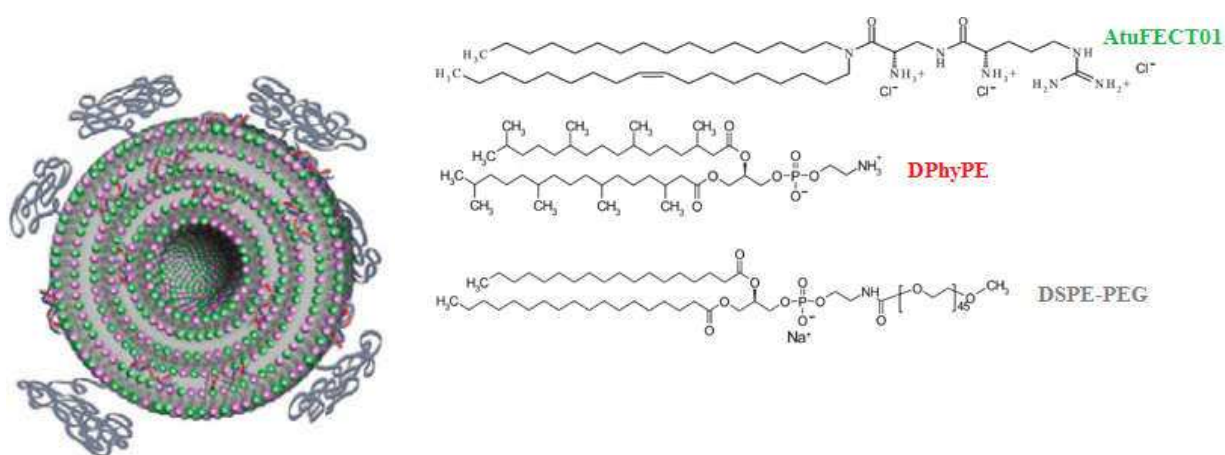


Figure 54 : Structure et composition du lipoplexe Atu027⁽¹²⁶⁾

Un essai clinique de Phase I a été mené chez des patients atteints de tumeurs solides avancées afin d'évaluer la sécurité, la tolérance et l'activité anti tumorale d'Atu027. Atu027 a montré une bonne tolérance jusqu'à 0,336 mg de siRNA/kg. Cette dose correspond à deux fois la valeur minimale menant à une activité antitumorale (Figure 55)⁽¹²⁵⁾. Une activation transitoire de la voie du complément a été observée par une augmentation de la production de C3a, Bb et SC5b-9, sans conduire à des manifestations allergiques.

L'évaluation des concentrations plasmatiques de 102 protéines solubles avant et après des injections répétées a permis de déceler une diminution de la concentration du variant soluble du récepteur au VEGF (sVEGFR1 [sFLT1]) chez 12 des 20 patients analysés (Figure 56). sVEGFR1, déjà décrit comme marqueur biologique de résistance aux traitements antiangiogéniques (*e.g* bevacizumab⁽¹²⁷⁾), pourrait être utilisé comme marqueur biologique de la réponse à Atu027.

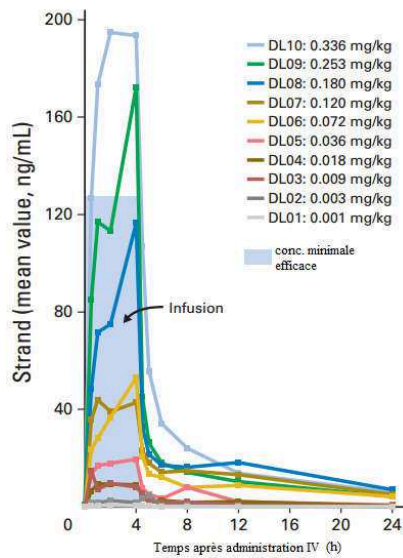


Figure 55 : concentration plasmatique en siRNA-anti PKN3 post injection d'Atu027⁽¹²⁵⁾

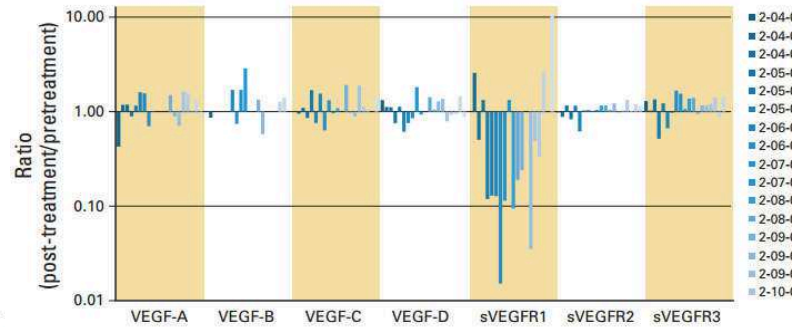


Figure 56 : Expression de différentes protéines solubles avant et après injection d'Atu027⁽¹²⁵⁾

L'injection d'Atu027 deux fois par semaine pendant quatre semaines s'est traduite par une stabilisation de la maladie chez 14 patients sur 27. L'observation des métastases a montré une réponse chez onze patients dont six ont eu une réduction partielle de métastases hépatiques, pulmonaires ou osseuses et un a eu une régression complète de métastases pulmonaires.

Les résultats obtenus sur des métastases et l'absence d'effets indésirables marqués (fatigue, troubles gastro-intestinaux, ...) ont encouragé le lancement d'un essai clinique de Phase I/II afin d'évaluer l'association d'Atu027 avec la Gemcitabine dans le traitement de cancers pancréatiques à un stade avancé ou métastatique⁽¹²⁸⁾.

4.3. TKM-PLK1 (ou TKM-080301)

TKM-080301, synthétisée par Tekmira Pharmaceuticals[®], est une nanoparticule lipidique d'environ 80 nm transportant des siRNA anti-PLK1⁽¹²⁹⁾ (Figure 57). PLK1 est une protéine essentielle au cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN, surexprimée dans de nombreux cancers tels que les mélanomes, les cancers ovariens ou colorectaux et son niveau d'expression est corrélé au pronostic dans le cancer du pancréas. Son inhibition conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose⁽¹³⁰⁾.

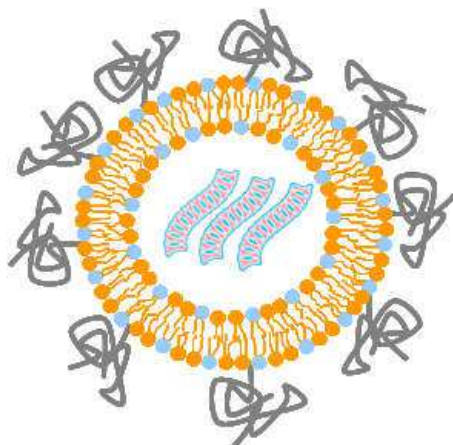


Figure 57 : Structure de TKM-080301⁽¹³¹⁾

La Phase I de l'essai clinique de TKM-080301 a été réalisée chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires aux traitements conventionnels. L'injection de doses croissantes a permis d'observer une bonne tolérance jusqu'à 0,75 mg de siRNA/kg. De plus, trois patients sur les neuf traités par des doses supérieures à 0,60 mg de siRNA/kg ont obtenu une stabilisation et un patient une réponse partielle au traitement par TKM-080301

(Figure 58). L'activité des siRNA a été confirmée, après biopsie, par 5'RACE par l'apparition de fragments d'ARNm de PLK1 après injection⁽¹²⁹⁾ (Figure 59).

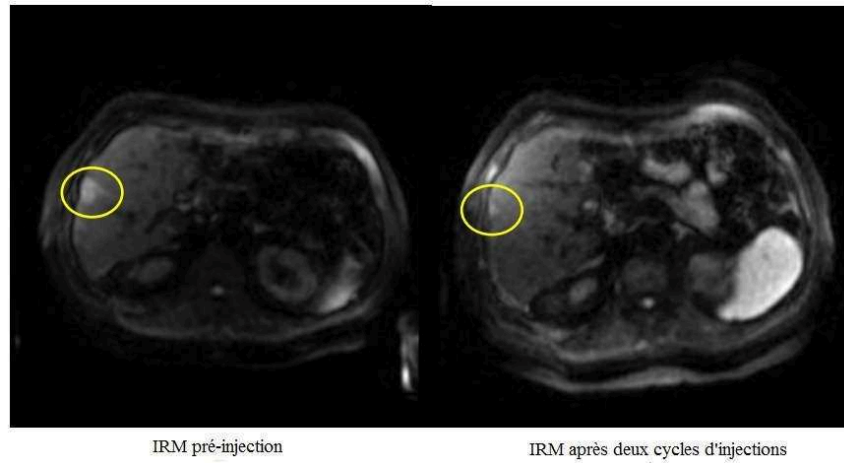


Figure 58 : IRM avant et après injection de TKM080301 montrant la réduction de la taille de la tumeur neuroendocrine⁽¹³¹⁾

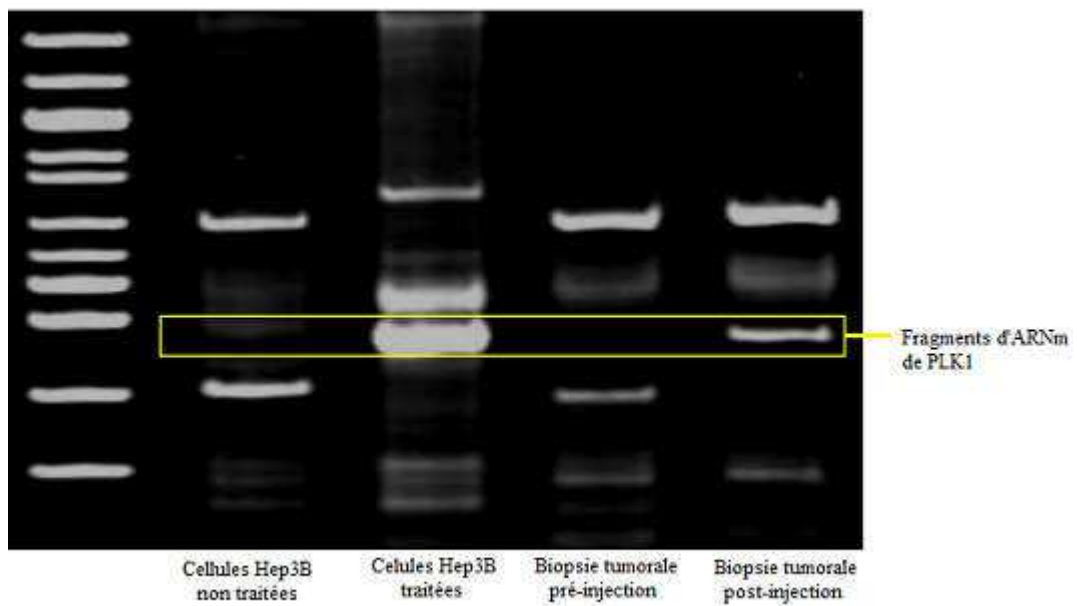


Figure 59 : 5'RACE montrant le clivage de l'ARNm de PLK1⁽¹³¹⁾

TKM-080301 est actuellement en Phase I/II en monothérapie dans le traitement de tumeurs gastro-intestinales neuroendocrines et de carcinomes hépatocellulaires. Les premiers résultats chez les patients atteints de carcinomes hépatocellulaires montrent une stabilisation de la maladie chez 51% des patients traités, une réponse partielle chez 22% et une réduction de la taille de la tumeur chez 59% des patients traités⁽¹³²⁾.

4.4. ALN-VSP

ALN-VSP est une nanoparticule lipidique de type SNALP de 80 à 100 nm de diamètre synthétisée par Alnylam[®], composée de deux lipides cationiques DLinDMA et DPPC, d'un lipide PEGylé mPEG-C-DMA et de cholestérol⁽¹³³⁾ (Figure 60). Ce nanovecteur possède la particularité de renfermer deux siRNA visant deux cibles différentes surexprimées dans de nombreux cancers⁽¹²⁹⁾ :

- VEGFA, impliquée dans l'angiogénèse tumorale,
- KSP, impliquée dans la formation du fuseau mitotique des cellules prolifératives.

une diminution de l'expression des ARNm de VEGFA et KSP et l'observation du clivage de l'ARNm de VEGFA par 5'RACE (Figure 62).



Figure 61 : IRM montrant la régression des métastases hépatiques après 12 et 40 doses d'ALN-VSP à 0,7 mg de siRNA/kg⁽¹³³⁾

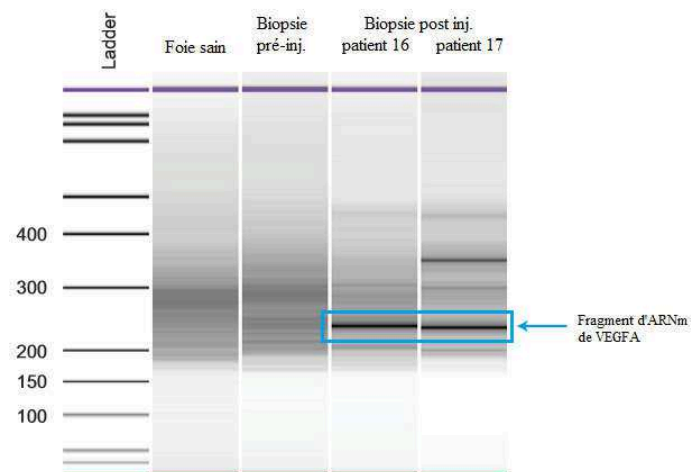


Figure 62 : 5'RACE montrant le clivage de l'ARNm de VEGFA⁽¹³³⁾

5. Discussion

L'ARN interférence est un phénomène basé sur la complémentarité de base entre un petit ARN non codant et sa cible. L'utilisation potentielle des siRNA en thérapeutique est permise par ses caractéristiques attractives : ils ont la capacité de cibler n'importe quel gène d'intérêt et montrent une action très efficace pour obtenir une inhibition puisque une concentration intracellulaire picomolaire peut conduire à une inhibition de 50% des ARNm concernés⁽¹²⁹⁾. Le mécanisme d'action est en outre catalytique, permettant une action prolongée. De plus, une conception précise et des modifications sont possibles pour limiter la survenue d'effets « off target » et d'immunostimulation sans altérer leur puissance.

Le développement de nanovecteurs a pu régler en partie les problèmes de délivrance systémique que posent les caractéristiques physico-chimiques des siRNA (charge très négative, poids moléculaire élevé, dégradation rapide) et la toxicité. Les résultats des premiers essais cliniques chez l'Homme ont confirmé la possibilité de délivrer des siRNA au niveau des tumeurs et la capacité d'inhiber l'expression génique.

Ces premiers pas prometteurs sont malgré tout à pondérer car des améliorations sont nécessaires avant d'envisager une utilisation à grande échelle. En particulier, La sélection des cibles, la délivrance intratumorale spécifique et la voie d'administration requièrent une connaissance plus approfondie.

5.1. Sélection de la cible

L'ARN interférence ayant la capacité d'agir sur tout gène, de nombreuses études ont montré l'activité *in vitro* et *in vivo* des siRNA pour inhiber spécifiquement un gène et

entraîner un effet bénéfique sur différents modèles de tumeurs⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾. Pour autant, toutes les cibles ne sont pas éligibles pour une utilisation en thérapie. La cible idéale doit être exprimée préférentiellement au niveau des tumeurs, provoquer une régression de la tumeur après inhibition et être associée à un biomarqueur pour évaluer la réponse clinique et biologique⁽¹³⁴⁾. Ainsi, la sélection de la cible du siRNA conditionne l'efficacité de la réponse au traitement ainsi que la survenue d'effets « off target » et « on target » (inhibition de la cible au niveau des tissus sains).

Les essais cliniques CALAA-01, Atu027, TKM-PLK1 et ALN-VSP ont ciblé différents gènes. Si l'activité des siRNA au niveau de la tumeur a été démontrée par 5'RACE, un seul cas de réponse complète a été observé, après injections d'ALN-VSP. La faible réponse à ces traitements peut être en partie expliquée par le choix de cibles non spécifiques d'un type de cancer. Le programme ICGC (International Cancer Genome Consortium⁽¹³⁵⁾) est actuellement mené pour réaliser le séquençage complet du génome de 50 types de cancers. L'identification de signatures mutationnelles pourrait fournir une base pour la sélection de cibles des siRNA plus spécifiques d'une tumeur.

La recherche de biomarqueurs associés à une réponse au traitement est encore peu développée lors de l'évaluation des cibles potentielles. Parmi les essais cliniques de phase I menés à l'heure actuelle, seul Atu027 a conduit à rechercher un biomarqueur de prédiction de la réponse au traitement. L'observation d'une diminution de la concentration en variant soluble du récepteur au VEGF, sVEGFR1, chez douze des vingt patients après injections d'Atu027, pourrait permettre de visualiser la réponse thérapeutique en cours de traitement.

5.2. Sélection des patients

La faible réponse observée lors des essais cliniques peut également s'expliquer par l'absence de sélection préalable des patients en fonction du statut génique de la tumeur. Ces essais cliniques de phase I ont pour objectif principal de mesurer la tolérance et la toxicité du médicament. L'absence de recrutement des patients en fonction de leur probabilité de réponse au traitement permet de finaliser rapidement l'essai clinique mais limite fortement l'observation d'une réponse positive⁽¹²⁹⁾.

La sélection rigoureuse des patients en fonction de signatures génétiques de leur tumeur est une piste envisageable pour déterminer l'efficacité des siRNA. Le développement du séquençage des tumeurs pourrait être un atout pour l'utilisation de l'ARN interférence en tant qu'agent thérapeutique. Grâce aux méthodes de séquençage nouvelle génération, le classement des tumeurs non plus en fonction de leur localisation mais selon les anomalies génomiques participant à leur développement et leur progression pourrait permettre l'instauration d'une médecine anticancéreuse personnalisée. Le séquençage tumoral individuel, en analysant la plasticité et la variabilité tumorale inter-individuelle, serait à même d'indiquer les séquences de siRNA à synthétiser pour obtenir un effet ciblé. Cette technique nécessite néanmoins de comprendre le rôle exact des gènes altérés dans le développement des tumeurs.

5.3. Délivrance intratumorale

L'instabilité des siRNA vis-à-vis des nucléases et leur incapacité à franchir les membranes cellulaires ont motivé le développement de nanovecteurs dans le but d'administrer les siRNA par voie systémique. L'engouement des chercheurs pour ces

vecteurs est tel qu'entre 2000 et 2016 le nombre de publications recensées sur PubMed avec le terme « nanoparticle » est passé de 312 à 18256 par an⁽¹³⁶⁾. Ainsi, une revue exhaustive des différents nanovecteurs ne m'a pas paru pertinente, mes recherches se sont donc concentrées sur les principales nanoparticules non virales développées pour la vectorisation de siRNA.

Les nanovecteurs lipidiques sont à l'heure actuelle les systèmes de délivrance de siRNA les plus développés. Ils s'avèrent efficaces pour cibler le foie par adsorption d'apolipoprotéine-E et endocytose médiée par les récepteurs au LDL et par opsonisation rapide conduisant à une clairance par le système réticulo-endothélial⁽¹³⁷⁾. La délivrance de ces nanovecteurs aux tumeurs extra-hépatiques s'avère plus complexe.

La synthèse de composés susceptibles de transporter les siRNA vers les tumeurs a mené à la réalisation de quatre essais cliniques évaluant l'administration systémique de siRNA, trois *via* des nanovecteurs lipidiques (Atu027, TKM-PLK1 et ALN-VSP) et un *via* un nanovecteur polymérique (CALAA-01). Les nanovecteurs lipidiques utilisés dans ces essais cliniques ont montré une immunostimulation probablement due à leur hydrophobicité, contrairement à CALAA-01. Le développement de nanovecteurs bien tolérés par l'organisme demeure un problème.

L'hétérogénéité intratumorale influe sur l'accumulation des nanoparticules. La majorité des études de biodistribution des nanoparticules se base sur des modèles animaux issus de la xénotransplantation de cellules tumorales. Le ciblage passif par effet EPR des nanoparticules y est globalement constant et le micro environnement tumoral peu présent. Or chez l'Homme, l'effet EPR est plus complexe à prédire. La perméabilité vasculaire varie en fonction de la localisation tumorale mais aussi au niveau de différents segments d'une

même tumeur. De plus, des changements spatiotemporels ont été observés par la présence de pores s'ouvrant et se fermant de manière transitoire⁽¹³⁸⁾. La délivrance inégale observée lors de l'essai clinique de CALAA-01 pourrait être due à une délivrance inconstante au niveau de la zone de biopsie plutôt qu'à une faible efficacité de vectorisation.

L'effet EPR est influencé par des médiateurs tels que le monoxyde d'azote, le VEGF ou la bradykinine⁽¹¹²⁾. La recherche de biomarqueurs prédictifs de l'effet EPR pourrait permettre d'évaluer la capacité d'accumulation des nanoparticules au niveau d'une tumeur.

L'extravasation des nanoparticules, l'hétérogénéité de viscosité tumorale et de pression oncotique ainsi que les interactions entre les nanoparticules et le microenvironnement tumoral (réseau dense de collagène, pression interstitielle élevée et présence de macrophages associés aux tumeurs) doivent être pris en compte avant la synthèse de nouveaux vecteurs.

Bien que de nombreuses études décrivant les caractéristiques générales des systèmes de délivrance soient disponibles, peu de publications traitent de la variation de la biodistribution d'une nanoparticule donnée en fonction de sa forme, sa taille et sa charge. Une meilleure connaissance de ces paramètres permettrait une meilleure compréhension des propriétés physico-chimiques optimisant la délivrance tumorale. L'hétérogénéité intratumorale pourrait conduire au développement de mélanges de nanoparticules de composition, taille, forme et charge différentes dans le but d'optimiser leur diffusion dans l'ensemble de la tumeur.

Le développement de nanovecteurs à visée théranostique, c'est-à-dire associant des propriétés d'imagerie et thérapeutique, présente plusieurs intérêts. Au-delà de la

vectorisation de siRNA vers leur cible, la possibilité de suivre en temps réel la distribution des nanovecteurs offre un outil de choix pour évaluer les variations intra- et inter-tumorales. Ces nanovecteurs permettent également le diagnostic et le suivi de la réponse tumorale. L'intégration de telles propriétés n'est actuellement pas envisageable du fait de la toxicité des matériaux à même d'engendrer ces capacités.

5.4. Ciblage tumoral

Le ciblage des tumeurs permet d'augmenter l'accumulation tumorale des nanoparticules et l'internalisation cellulaire. CALAA-01 est le premier essai clinique ayant inclus un ligand de ciblage, la transferrine, à la surface d'un nanovecteur de siRNA. Les résultats montrent une accumulation préférentielle au niveau de la cible mais aussi une toxicité qui pourrait être engendrée par une faible stabilité de la transferrine dans le temps. D'autres molécules telles que l'acide folique, les aptamères ou les peptides ont montré de bonnes dispositions pour optimiser la délivrance ciblée de siRNA. Le ratio ligand/nanoparticule et l'optimisation de l'intégration à la surface des nanovecteurs (interactions avec le PEG) sont des éléments à évaluer pour faciliter la reconnaissance des récepteurs cellulaires.

L'hétérogénéité dans l'expression de récepteurs à la surface des cellules tumorales doit également être prise en compte lors de la synthèse de nanovecteurs ciblés. L'incorporation de plusieurs ligands spécifiques des tumeurs à la surface d'une même nanoparticule pourrait élargir l'éventail des cellules ciblées. La synthèse de mélanges de nanoparticules intégrant chacune un ligand différent est une alternative pour limiter l'encombrement que poserait l'intégration de plusieurs ligands à la surface d'une nanoparticule.

5.5. Voie d'administration

Mes recherches se sont concentrées principalement sur la délivrance systémique des siRNA, cette voie offrant une action sur un large type de cancers et permettant une action à la fois sur les tumeurs localisées et les métastases. Les difficultés rencontrées lors du développement de systèmes de vectorisation sont encore nombreuses : toxicité des nanovecteurs et « off target », difficulté de ciblage, accumulation hépatique, ... L'administration locale limite les cibles tumorales mais permet de s'affranchir du premier passage hépatique et de l'inconstance de la distribution tumorale contrairement aux voies systémiques.

La voie intrapéritonéale dans le traitement de cancers ovariens⁽¹³⁹⁾ et la voie pulmonaire dans le traitement de tumeurs localisées à la sphère ORL⁽⁵²⁾ sont l'objet de beaucoup d'attention. Ces injections localisées réduisent les risques de toxicité systémique et favorisent une accumulation au niveau de la cible.

Récemment, siG12D-LODER est entré en essai clinique de phase I/IIa, en association avec des chimiothérapies conventionnelles (*i.e* Gemcitabine ou FOLFIRINOX), pour évaluer la tolérance dans le traitement de carcinomes pancréatiques localement avancés, après une injection intratumorale⁽¹⁴⁰⁾. siG12D-LODER est composé d'une matrice polymérique biodégradable (LODER) enfermant un siRNA anti-KRAS (G12D). Une étude pré-clinique dans un modèle murin a permis d'observer la dispersion du nanovecteur dans toute la tumeur après une semaine et une distribution locale de siRNA prolongée durant quatre mois. Chez l'Homme, siG12D-LODER a été bien toléré, les effets indésirables relevés étant causés en majorité par la chimiothérapie. Parmi les 15 patients traités, la

plupart ont eu une stabilisation de la maladie et deux ont eu une réponse partielle. Un essai clinique de phase II/b est actuellement en cours.

5.6. Co-administration

L'ARN interférence permet également l'extinction concomitante de plusieurs gènes simultanément. Le développement et la progression d'un cancer ne sont pas le résultat d'une altération génique isolée mais le fruit d'altérations géniques multiples associées à des altérations épigénétiques. De plus, il existe une certaine plasticité au sein d'une même population de cellules tumorales. L'hétérogénéité intratumorale qui en résulte peut limiter l'action de formulations ne délivrant qu'un type de siRNA. ALN-VSP, en associant des siRNA ciblant VEGFA et KSP, a montré qu'il était possible de délivrer dans un même nanovecteur deux siRNA différents au niveau des tumeurs.

Des études *in vivo* ont également étudié avec succès l'association de siRNA avec des chimiothérapies conventionnelles⁽⁴³⁾⁽¹⁰⁵⁾. Atu027 est actuellement en essai clinique de phase I/II en association avec la Gemcitabine, un antimétabolite. La co-administration de chimiothérapies et de siRNA ciblant les gènes de résistance aux chimiothérapies est elle aussi déjà explorée *in vivo* et mériterait d'être évaluée en essai clinique.

L'action sur plusieurs cibles est également possible par l'administration de miRNA. De plus en plus d'études s'intéressent à ces petits ARN. Un miRNA est en mesure de cibler des centaines d'ARNm différents par complémentarité imparfaite de séquence. Les miRNA pourraient donc être une alternative à l'administration de plusieurs siRNA grâce à leur action plus large. Les cibles des miRNA doivent cependant être bien étudiées car un même miRNA peut jouer à la fois le rôle d'oncogène ou de gène suppresseur de tumeur en

fonction du contexte cellulaire. Le premier essai clinique de phase I concernant un miRNA (MRX34, enfermé dans un liposome) a débuté en 2014 chez des patients atteints de carcinomes hépatocellulaires ou de cancers métastatiques avec atteinte hépatique⁽¹⁴¹⁾. Malgré l'absence de toxicité, l'étude a été stoppée après la survenue de réponses immunitaires sévères ayant entraîné thrombocytopénie, dyspnée, asthénie, et diarrhée⁽¹⁴²⁾. Une analyse des mécanismes impliqués dans le déclenchement de cette réponse immunitaire doit être réalisée avant d'envisager la réalisation d'un nouvel essai clinique.

Conclusion

L'ARN interférence est un outil formidable pour étudier la modulation de l'expression génique *in vitro*. La possibilité d'inhiber un gène d'intérêt avec une grande spécificité et une grande efficacité a soulevé de grands espoirs dans le développement d'une thérapie personnalisée pour lutter contre le cancer. Les grandes compagnies telles que Merck, Novartis et Roche ont rapidement investi dans le domaine des siRNA avant de progressivement laisser la place aux compagnies pionnières (*e.g.* Alnylam, Silence Therapeutics), faute de résultats probants pour surpasser leur dégradation rapide, leur faible internalisation cellulaire et le déclenchement d'effets « off target ».

Le développement de la délivrance locale, si elle ne permet qu'une action restreinte aux tumeurs localisées, apparaît comme une alternative pour s'affranchir des barrières actuelles.

La confrontation des connaissances précliniques avec les résultats obtenus lors des essais cliniques, le développement de modèles plus proches de la physiopathologie humaine et la synthèse de nouveaux matériaux non toxiques pour améliorer la délivrance ciblée de ces molécules demeurent des enjeux cruciaux pour leur utilisation thérapeutique.

Enfin, le coût global de ces thérapies basées sur des traitements personnalisés en fonction du séquençage tumoral et des paramètres propres à la physiologie tumorale individuelle devra être pris en compte avant l'élaboration d'applications à grande échelle.

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de miRNA impliqués dans la différenciation cellulaire.....	21
Tableau 2 : Principaux paramètres pour la synthèse de siRNA fonctionnels.....	43
Tableau 3 : Principaux essais cliniques utilisant des siRNA transportés par des nanovecteurs non viraux pour le traitement de tumeurs⁽¹²⁰⁾.....	94

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Phénotypes des fleurs de pétunias modifiées par le transgène <i>chs</i> ⁽⁹⁾	10
Figure 2 : voie des siRNA.....	14
Figure 3 : Structure de DICER ⁽¹⁵⁾	15
Figure 4 : Structure de TRBP ⁽¹⁷⁾	16
Figure 5 : Structure d'un siRNA ⁽¹³⁾	17
Figure 6 : Structure des protéines Ago chez l'Homme. Les domaines N-ter, MID et PIWI forment une cavité partiellement remplie par le domaine PAZ ⁽¹⁵⁾	18
Figure 7 : ARN de <i>lin-4</i> et complémentarité avec l'ARNm de <i>lin-14</i> ⁽²⁰⁾	20
Figure 8 : Voie d'extinction post-transcriptionnelle médiée par les miRNA ⁽²⁶⁾	22
Figure 9 : phase nucléaire de la biosynthèse de miRNA (A) transcription de précurseurs polycistroniques, (B) régions intergéniques, (C) transcription au niveau d'introns (en gris) ou d'exons (en noir). TF : facteur de transcription ⁽²⁸⁾	24
Figure 10 : Structure de DROSHA et DGCR8 chez l'Homme ⁽¹⁵⁾	25
Figure 11: fixation du microprocesseur nucléaire sur le pri-miRNA ⁽²⁹⁾	26
Figure 12 : Voie d'inhibition de la traduction protéine GW182-dépendante ⁽¹⁶⁾	29
Figure 13 : Voie d'inhibition de la traduction protéine GW182-indépendante ⁽¹⁶⁾	29
Figure 14 : Voie des piRNA et phénomène "ping pong" ⁽³¹⁾	32
Figure 15 : effecteurs exogènes de l'ARNi.....	34
Figure 16 : Cibles potentielles des siRNA en oncologie ⁽³⁹⁾	39
Figure 17 : appariement G-C via trois liaisons hydrogène.....	41
Figure 18 : appariement A-U via deux liaisons hydrogène.....	41
Figure 19 : réponse immunitaire après activation des voies TLR dépendantes et TLR non dépendantes ⁽⁵⁶⁾	48
Figure 20 : 2'-O-méthyl RNA	54
Figure 21 : 2'-F RNA	54
Figure 22 : Unlocked Nucleic Acid (UNA)	54
Figure 23 : Locked Nucleic Acid (LNA)	54
Figure 24 : Phosphorothioate	55
Figure 25 : Boranophosphate	55
Figure 26 : siRNA conjugué à l' α -tocopherol ⁽⁷²⁾	57
Figure 27 : siRNA conjugué à trois GalNAc ⁽⁷⁴⁾	58
Figure 28 : Poly (éthylène glycol)	62
Figure 29 : facteurs influençant la biodistribution des nanovecteurs ⁽³⁹⁾	65
Figure 30 : Poly (éthylène imine) (a) forme linéaire (b) forme branchée.....	67
Figure 31 : Structure générale des dendrimères.....	68
Figure 32 : Chitosane ⁽⁸⁷⁾	70
Figure 33: α , β et γ cyclodextrines ⁽⁸⁷⁾	71
Figure 34 : obtention de l'atélocollagène ⁽⁹⁴⁾	72
Figure 35 : Liposome.....	73
Figure 36 : DOPE	74
Figure 37 : SNALP	76
Figure 38 : structure des MNP et exemples de fonctionnalisation ⁽⁶³⁾	78
Figure 39 : IRM d'une souris souris 5 min et 6H après injection de siPLK1-SPION ⁽⁹⁹⁾	79

Figure 40 : Application d'un champ magnétique externe après injection de nanovecteurs magnétiques chez la souris⁽¹⁰⁰⁾	79
Figure 41 : expression intratumorale de l'ARNm cMyc et biodistribution des siRNA 12H post-administration⁽¹⁰⁰⁾	80
Figure 42 : structure et exemples de nanoparticules d'or⁽⁶³⁾	81
Figure 43 : structure des MSN sphériques et exemples de fonctionnalisation⁽⁶³⁾	83
Figure 44 : structure des CNT et GO et exemples de fonctionnalisation⁽⁶³⁾	85
Figure 45 : structure des QDs et exemple de fonctionnalisation⁽¹¹⁰⁾	86
Figure 46 : Folate	88
Figure 47 : siRNA conjugué à du folate-PEG⁽¹¹⁴⁾	89
Figure 48 : (A) Evolution de la taille tumorale en fonction du temps après injection, (B) taille de la tumeur après injection (C) niveau d'expression du VEGF au sein de la tumeur⁽¹¹⁵⁾	90
Figure 49 : peptide RGD cyclique - PEG	92
Figure 50 : Niveau d'expression de VEGF et Bcl-2 après injection de siRNA seul, Au-DENPs/siRNA et Au-DENPs-RGD/siRNA⁽¹¹⁹⁾	93
Figure 51 : Structure et composition de CALAA-01⁽¹²²⁾	95
Figure 52 : Expression de l'ARNm de RRM2 pré et post-traitement par CALAA-01⁽¹²⁴⁾	96
Figure 53 : 5'RACE montrant le clivage de l'ARNm de RRM2⁽¹²⁴⁾	96
Figure 54 : Structure et composition du lipoplexe Atu027⁽¹²⁶⁾	97
Figure 55 : concentration plasmatique en siRNA-anti PKN3 post injection d'Atu027⁽¹²⁵⁾	99
Figure 56 : Expression de différentes protéines solubles avant et après injection d'Atu027⁽¹²⁵⁾	99
Figure 57 : Structure de TKM-080301⁽¹³¹⁾	100
Figure 58 : IRM avant et après injection de TKM080301 montrant la réduction de la taille de la tumeur neuroendocrine⁽¹³¹⁾	101
Figure 59 : 5'RACE montrant le clivage de l'ARNm de PLK1⁽¹³¹⁾	101
Figure 60 : Structure et composition d'ALN-VSP⁽¹³³⁾	103
Figure 61 : IRM montrant la régression des métastases hépatiques après 12 et 40 doses d'ALN-VSP à 0,7 mg de siRNA/kg⁽¹³³⁾	104
Figure 62 : 5'RACE montrant le clivage de l'ARNm de VEGFA⁽¹³³⁾	104

BIBLIOGRAPHIE

1. **Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P.** Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European Heart Journal*. 14 08 2016, Vol. 37, 42, pp. 3232-3245.
2. Le cancer en chiffres. *Fondation ARC*. [En ligne] 08 Août 2016. <http://www.fondation-arc.org/Face-au-cancer/le-cancer-en-chiffres.html#>.
3. **Fire A., Mello C.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 19 Fev. 1998, 391, pp. 806-811.
4. **Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K.** Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Research*. 14 01 2005, Vol. 33, 1, pp. 439-447.
5. **Whitehead KA, Langer R, Anderson DG.** Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 02 2009, Vol. 8, 2, pp. 129-138.
6. **Watts JK, Deleavey GF, Damha MJ.** Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discovery Today*. 10 2008, Vol. 13, 19-20, pp. 842-855.
7. **Makarova J A, Shkurnikov M U, Wicklein D.** Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 25 06 2016.
8. **Hammond SM.** An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 12 05 2015, Vol. 87, pp. 3-14.
9. **Napoli C, Jorgensen R, Lemieux C.** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 04 1990, Vol. 2, pp. 279-289.
10. **Romano N, Macino G.** Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*. 11 1992, Vol. 6, pp. 3343-3353.
11. **Hamilton A J, Baulcombe D C.** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 29 10 1999, Vol. 286, pp. 950-952.
12. **T, Tuschl.** RNA Interference and Small Interfering RNAs. *ChemBioChem*. 01 04 2001, Vol. 2, pp. 239-245.
13. **Elbashir S M, Tuschl T, Lendeckel W.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 24 05 2001, Vol. 411, pp. 494-498.

14. **Piatek MJ, Werner A.** Endogenous siRNAs, regulators of internal affairs. *Biochemical Society transactions*. 08 2014, Vol. 42, 4, pp. 1174-1179.
15. **Costa M C, Leitão A L, Enguita F J.** Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs: Insights from the Point of View of Structural Biology. *International Journal of Molecular Sciences*. 17 08 2012, Vol. 13, pp. 10268-10295.
16. **Connerty P, Ahadi A, Hutvagner G.** RNA binding proteins in the miRNA pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 01 2016, Vol. 17.
17. **Daniels SM, Gatignol A.** The Multiple Functions of TRBP, at the Hub of Cell Responses to Viruses, Stress and Cancer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 09 2012, Vol. 76, 3, pp. 652-666.
18. **Jinek M, Doudna JA.** A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*. 22 01 2009, Vol. 457, pp. 405-412.
19. **Wilson R C, Doudna J A.** Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of biophysics*. 05 2013, Vol. 42, pp. 217-239.
20. **Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 3 12 1993, Vol. 75, pp. 843-854.
21. **Pasquinelli A E, Reinhart B J, Slack F.** Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 02 11 2000, Vol. 408, pp. 86-89.
22. **miRBase.** [En ligne] [Citation : 10 02 2017.] www.mirbase.org.
23. **Gori M, Trombetta M, Santini D.** Tissue engineering and microRNAs: future perspectives in regenerative medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 22 07 2015, Vol. 15, pp. 1601-1622.
24. **Chistiakov D A, Orekhov A N, Bobryshev.** Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 05 2016, Vol. 94, pp. 107-121.
25. **Jardin F, Ruminy P, Penther D.** Micro-RNA en hématologie. *Hématologie*. 03-04 2008, Vol. 14.
26. Interaction virus - cellule. afd-ld.org. [En ligne] [Citation : 10 02 2017.] http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction.
27. **Tanzer A, Stadler PF.** Evolution of MicroRNAs. *Method in Molecular Biology*. 2006, Vol. 342, pp. 335-350.

28. **Fazi F, Nervi C.** MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination . *Cardiovascular Research*. 06 06 2008, pp. 553-561.
29. **Nguyen T A, Jo M H, Choi Y G.** Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*. 04 06 2015, Vol. 161, pp. 1374-1387.
30. **Fabian RM, Sonenberg N, Filipowicz W.** Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of biochemistry*. 07 07 2010, Vol. 79, 1, pp. 351-379.
31. **Voigt F, Reuter M, Kasaruho A.** Crystal structure of the primary piRNA biogenesis factor Zucchini reveals similarity to the bacterial PLD endonuclease Nuc. *RNA*. 12 2012, Vol. 18, pp. 2128-2134.
32. **Brennecke J, Aravin A A, Stark A.** Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell*. 23 03 2007, Vol. 128, pp. 1089-1103.
33. **Stephenson ML, Zamecnik.** Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978, Vol. 75, 1, pp. 285-288.
34. **Masiero M, Nardo G, Indraccolo S.** RNA interference: Implications for cancer treatment. *Molecular Aspects of Medicine*. 02 2007, Vol. 28, pp. 143-166.
35. **Kim DH, Behlke MA, Rose SD.** Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*. 02 2005, Vol. 23, 2, pp. 222-226.
36. **Bobbin ML, Rossi JJ.** RNA Interference (RNAi)-based therapeutics : delivering the promise ? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 01 2016, Vol. 56, pp. 103-122.
37. **Wang T, Shigdar S, Al Shamaileh H.** Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment. *Cancer Letters*. 28 02 2017, Vol. 387, pp. 77-83.
38. **Crombez L, Morris MC, Dufort S.** Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acid Research*. 08 2009, Vol. 37, 14, pp. 4559-4569.
39. **Resnier P, Montier T, Mathieu V.,** A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials*. 09 2013, Vol. 34, pp. 6429-6443.
40. **Tanaka T, Mangala LS, Vivas-Mjia PE.** Sustained Small Interfering RNA Delivery by Mesoporous Silicon Particles. *Cancer Research*. 01 05 2010, Vol. 70, 9, pp. 3687-3696.

41. **Zhou Z, Li H, Wang K.** Bioreducible Cross-Linked Hyaluronic Acid/Calcium Phosphate Hybrid Nanoparticles for Specific Delivery of siRNA in Melanoma Tumor Therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 20 04 2017.
42. **Guo J, Cheng WP, Gu J.** Systemic delivery of therapeutic small interfering RNA using a pH-triggered amphiphilic poly-L-lysine nanocarrier to suppress prostate cancer growth in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, Vol. 45, pp. 521-532.
43. **Butt AM, Amin MC, Katas H.** Doxorubicin and siRNA Codelivery via Chitosan-Coated pH-Responsive Mixed Micellar Polyplexes for Enhanced Cancer Therapy in Multidrug-Resistant Tumors. *Molecular Pharmaceutics*. 2016, Vol. 13, 12, pp. 4179-4190.
44. **Tafer H, Ameres S L, Obernosterer G.** The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nature Biotechnology*. 27 04 2008, Vol. 26, pp. 578-583.
45. **Kanasty R L, Whitehead K A, Vegas A J.** Action and Reaction: The Biological Response to siRNA and Its Delivery Vehicles. *Molecular Therapy*. 20 03 2012, Vol. 20, pp. 513-524.
46. **Fakhr E, Zare F and Teimoori-Toolabi L.** Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Therapy*. 18 03 2016, Vol. 23, pp. 73-82.
47. **Dharmacon, GE.** RNAi & Custom RNA Synthesis. [En ligne] [Citation : 26 01 2017.] <http://dharmacon.gelifesciences.com/rnai-and-custom-rna-synthesis/>.
48. siDirect. [En ligne] [Citation : 26 01 2017.] <http://sidirect2.rnai.jp/>.
49. **H, Donis-Keller.** Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Research*. 1979, Vol. 7, pp. 179-192.
50. **Jose A, Labala S, Venuganti VV.** Co-delivery of curcumin and STAT3 siRNA using deformable cationic liposomes to treat skin cancer. *Journal of drug targeting*. 04 2017, Vol. 25, 4, pp. 330-341.
51. **Mangala LS, Han HD, Lopez-Berestein G.** Liposomal siRNA for ovarian cancer. *Methods in molecular biology*. 29 05 2009, Vol. 555, pp. 29-42.
52. **Yan Y, Zhou K, Xiong H.** Aerosol delivery of stabilized polyester-siRNA nanoparticles to silence gene expression in orthotopic lung tumors. *Biomaterials*. 02 2017, Vol. 118, pp. 84-93.
53. **Seth S, Matsui Y, Fosnaugh K.** RNAi-based therapeutics targeting survivin and PLK1 for treatment of bladder cancer. *Molecular Therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 05 2011, Vol. 19, 5, pp. 928-935.

54. **PJ, White.** Barriers to successful delivery of short interfering RNA after systemic administration. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 11 2008, Vol. 35, 11, pp. 1371-1376.

55. **Varkouhi AK, Scholte M, Storm G.** Endosomal escape pathways fo delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*. 10 05 2011, Vol. 151, 3, pp. 220-228.

56. **Thompson J V, Locarnini S A.** Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunology and Cell Biology*. 31 07 2007, Vol. 85, pp. 435-445.

57. **Owen J A, Punt J, Stranford S A.** *Immunologie : Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. 7e édition. 2014. pp. 156-158.

58. **Whitehead KA, Dahlman JE, Langer RS.** Silencing or Stimulation ? siRNA delivery and the immune system. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2011, Vol. 2, pp. 77-96.

59. **Poeck H, Besch R, Maihofer C.** 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nature Medicine*. 11 2008, Vol. 14, 11, pp. 1256-1263.

60. **M, Lemoine.** Animal extrapolation in preclinical studies: An analysis of the tragic case of TGN1412. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*. 02 2017, Vol. 61, pp. 35-45.

61. RNAXs Web Server. [En ligne] [Citation : 26 01 2017.] <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAXs/RNAXs.cgi>.

62. **Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O.** Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine*. 2005, Vol. 11, pp. 50-55.

63. **Draz MS, Fang BA, Zhang P.** Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections. *Theranostics*. 11 06 2014, Vol. 4, pp. 872-892.

64. **Miele E, Spinelli G P, Di Fabrizio E.** Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA : challenges for cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 20 07 2012, Vol. 7, pp. 3637-3657.

65. **Deleavey G F, Damha M J.** Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing. *Chemistry & Biology*. 24 08 2012, Vol. 19, pp. 937-954.

66. **Allerson CR, Sioufi N, Jarres R.** Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA. *Journal of medicinal chemistry*. 24 02 2005, Vol. 48, 4, pp. 901-904.

67. **Pasternak A, Wengel J.** Unlocked nucleic acid-an RNA modification with broad potential. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 02 2011, Vol. 9, pp. 3591-3597.
68. **Ku S H, Jo S D, Lee Y K.** Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 01 09 2016, Vol. 104, pp. 16-28.
69. **Chu TC, Twu KY, Ellington AD.** Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Research*. 2006, Vol. 34, 10.
70. **Lee SH, Kang YY, Jang HE.** Current Preclinical Small Interfering RNA (siRNA)-based Conjugate Systems for RNA Therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 01 09 2016, Vol. 104, pp. 78-92.
71. **Lee SJ, Kim MJ, Kwon IC.** Delivery strategies and potential targets for siRNA in major cancer types. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 01 09 2016, Vol. 104, pp. 2-15.
72. **Nishina K, Unno T, Uno Y.** Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol. *Molecular Therapy*. 04 2008, Vol. 16, 4, pp. 734-740.
73. **Zhi D, Zhao Y, Cui S.** Conjugates of small targeting molecules to non-viral vectors for the mediation of siRNA. *Acta biomaterialia*. 05 2016, Vol. 36, pp. 21-41.
74. **Nair JK, Willoughby JL, Chan A.** Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *Journal of the American Chemical Society*. 10 12 2014, Vol. 136, 49, pp. 16958-16961.
75. **Muratovska A, Eccles MR.** Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *Febs Letters*. 30 01 2004, Vol. 558, 1-3, pp. 63-68.
76. **Fang B, Jiang L, Zhang M.** A novel cell-penetrating peptide TAT-A1 delivers siRNA into tumor cells selectively. *Biochimie*. 02 2013, Vol. 95, 2, pp. 251-257.
77. **Gao Y, Liu X L, Li X R.** Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *International Journal of Nanomedicine*. 11 5 2011, Vol. 6, pp. 1017-1025.
78. ISO/TS 80004-2/2015. [En ligne] 2015. <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:54440:fr>.
79. **Strebhardt K, Ullrich A.** Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*. 06 2008, Vol. 8, pp. 473-480.
80. **Scomparin A, Polyak D, Krivitsky A.** Achieving successful delivery of oligonucleotides - From physico-chemical characterization to in vivo evaluation. *Biotechnology Advances*. 01 11 2015, Vol. 33, pp. 1294-1309.

81. **Maeda H, Fang J, Nakamura H.** The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 18 03 2011, Vol. 63, pp. 136-151.
82. **Young S W S, Stenzel M, Lin Y J.** Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy? *Critical reviews in Oncology Hematology*. 02 2016, Vol. 98, pp. 159-169.
83. **Yang Y, Xuejun X, Dong W.** Acid Sensitive Polymeric Micelles Combining Folate and Bioreducible Conjugate for Specific Intracellular siRNA Delivery. *Macromolecular Bioscience*. 05 2016, Vol. 16, pp. 759-773.
84. **Breunig M, Hozsa C, Lugwitz U.** Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: disulfide bonds boost intracellular release of the cargo. *Journal of Controlled Release*. 25 08 2008, Vol. 130, pp. 57-63.
85. **Lee J M, Yoon T J, Cho Y S.** Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. *BioMed Research International*. 2013, Vol. 2013.
86. **Dahlman J E, Barnes C, Khan O F.** In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nature Nanotechnology*. 11 05 2014, Vol. 9, pp. 648-655.
87. **Singha K, Namgung R, Kim W J.** Polymers in Small-Interfering RNA delivery. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2011, Vol. 21.
88. **Zhou J, Shum K T, Burnett J C.** Nanoparticle-based delivery of RNAi therapeutics : progress and challenges. *Pharmaceuticals*. 16 01 2016, Vol. 6, pp. 85-107.
89. **Patil M L, Zhang M, Taratula O.** Internally cationic polyamidoamine PAMAM-OH dendrimers for siRNA delivery: effect of the degree of quaternization and cancer targeting. *Biomacromolecules*. 02 2009, Vol. 10, pp. 258-266.
90. **Biswas S, Deshpande PP, Dodwadkar NS.** Lipid modified triblock PAMAM-based nanocarriers for siRNA drug co-delivery. *Biomaterials*. 01 2013, Vol. 34, pp. 1289-1301.
91. **Gidwani B, Vyas A.** A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Research International*. 25 10 2015, Vol. 2015.
92. **Ashihara E, Kawata E, Maekawa T.** Future Prospect of RNA Interference for Cancer Therapies. *Current Drug Targets*. 2010, Vol. 11, 3, pp. 345-360.
93. **Fujimoto I, Takei Y.** Atelocollagen-mediated siRNA delivery : future promise for therapeutic application. *Therapeutic Delivery*. 2014, Vol. 5, 4, pp. 369-371.
94. About Collagen : Koken Co., Ltd. [En ligne] [Citation : 05 02 2017.] <http://www.kokenmpc.co.jp/english/support/tecncial/collagen/>.

95. **Kawata E, Ashihara E, Kimura S.** Administration of PLK-1 small interfering RNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 09 2008, Vol. 7, 9, pp. 2904-2912.
96. **Ozpolat B, Sood A K, Lopez-Berestein G.** Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 02 2014, Vol. 66, pp. 110-116.
97. **Zatsepin T S, Kotelevtsev Y V, Koteliansky V.** Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery-going from bench to bedside. *International Journal of Nanomedicine*. 05 07 2016, Vol. 11, pp. 3077-3086.
98. **Guo X, Szoka F C.** Steric Stabilization of Fusogenic Liposomes by a Low-pH Sensitive PEG–Diortho Ester–Lipid Conjugate. *Bioconjugate Chemistry*. 16 02 2001, Vol. 12, pp. 291-300.
99. **Mahajan UM, Teller S, Sandler M.** Tumor-specific delivery of siRNA-coupled superparamagnetic iron oxide nanoparticles, targeted against PLK1, stops progression of pancreatic cancer. *Gut*. 12 05 2016, Vol. 65, 11, pp. 1838-1849.
100. **Yang Y, Xie X, Xu X.** Thermal and magnetic dual responsive liposomes with a cell-penetrating peptide-siRNA conjugate for enhanced and targeted cancer therapy. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*. 1 10 2016, Vol. 146, pp. 607-615.
101. **Wu J, Liu B, Wu H.** A Gold Nanoparticle Platform for the Delivery of Functional TGF- β 1 siRNA Into Cancer Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 04 04 2016, Vol. 12, pp. 800-810.
102. **Chen Y, Wang X, Liu T.** Highly effective antiangiogenesis via magnetic mesoporous silica-based siRNA vehicle targeting the VEGF gene for orthotopic ovarian cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, Vol. 10, pp. 2579-2594.
103. **Li X, Chen Y, Wang M.** A mesoporous silica nanoparticle - PEI - Fusogenic peptide system for siRNA delivery in cancer therapy. *Biomaterials*. 01 2013, Vol. 34, pp. 1391-1401.
104. **Hom C, Lu J, Liang M.** Mesoporous silica nanoparticles facilitate delivery of siRNA to shutdown signaling pathways in mammalian cells. *Small*. 06 06 2010, Vol. 6, pp. 1185-1190.
105. **Meng H, Mai W X, Zhang H.** Co-delivery of an Optimal Drug/siRNA Combination Using Mesoporous Silica Nanoparticle to Overcome Drug Resistance in Breast Cancer In Vitro and In Vivo. *ACS Nano*. 26 02 2013, Vol. 7, pp. 994-1005.
106. **Varkouhi A K, Foillard S, Lammers T.** SiRNA delivery with functionalized carbon nanotubes. *International Journal of Pharmaceutics*. 20 09 2011, Vol. 416, pp. 419-425.

107. **Podesta J E, Al-Jamal K T, Herrero M A.** Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic siRNA silencing in a human lung xenograft model. *Small*. 05 2009, Vol. 5, pp. 1176-1185.
108. **Huang Y P, Hung C M, Hsu Y C.** Suppression of Breast Cancer Cell Migration by Small Interfering RNA Delivered by Polyethylenimine-Functionalized Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters*. 12 05 2016, Vol. 11.
109. **Zhao J, Qiu X, Wang Z.** Application of quantum dots as vectors in targeted survivin gene siRNA delivery. *OncoTargets and Therapy*. 03 04 2013, Vol. 6, pp. 303-309.
110. **Li S, Li Z, Ji F.** Delivery of Quantum Dot-siRNA Nanoplexes in SK-N-SH Cells for BACE1 Gene Silencing and Intracellular Imaging. *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 24 04 2012, Vol. 1.
111. **Maeda H, Wu J, Sawa T.** Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*. 2000, Vol. 65, pp. 271-284.
112. **Yin H, Liao L, Fang J.** Enhanced Permeability and Retention Effect based tumor targeting : the concept, application and prospect. *JSM Clinical Oncology and Research*. 2014, Vol. 2.
113. *Mises à jour en Gynécologie et Obstétrique. I, Ray-Coquard.* Paris : s.n., 2010.
114. **Dohmen C, Fröhlich T, Lächelt U.** Defined Folate-PEG-siRNA Conjugates for Receptor-specific Gene Silencing. *Molecular Therapy–Nucleic Acids*. 01 2012, Vol. 1, 1.
115. **Li J M, Wang Y Y, Zhang W.,** Low-weight polyethylenimine cross-linked 2-hydroxypopyl- β -cyclodextrin and folic acid as an efficient and nontoxic siRNA carrier for gene silencing and tumor inhibition by VEGF siRNA. *International Journal of Nanomedicine*. 05 06 2013, Vol. 8, pp. 2101-2117.
116. **Grabowska AM, Kircheis R, Kumari R.** Systemic in vivo delivery of siRNA to tumours using combination of polyethyleneimine and transferrin–polyethyleneimine conjugates. *Biomaterials Science*. 2015, Vol. 3, 11, pp. 1439-1448.
117. **Sando Z, Djomou F, Mouelle Sone A.** Biologie de la progression cancéreuse : rôle des intégrines. *Health Sciences and Disease*. 06 2010, Vol. 11.
118. **Schiffelers R M, Ansari A, Xu J.,** Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Research*. 01 11 2004, Vol. 32.
119. **Kong L, Wu Y, Alves C S.** Efficient delivery of therapeutic siRNA into glioblastoma cells using multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Nanomedicine*. 04 11 2016.

120. ClinicalTrials.gov. [En ligne] [Citation : 07 02 2017.] <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=sirna&Search=Search>.

121. **RA, Meyers.** *Translational Medicine Cancer*. 2016. p. 759.

122. **Corporation, Arrowhead Research.** Arrowhead Research Corporation / RONDEL. [En ligne] [Citation : 10 02 2017.] <http://arrowheadnew.designlogic.us/technology/rondel>.

123. **Davis M E, Zuckerman J E, Choi C H J.** Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. 15 04 2010, Vol. 464, pp. 1067-1070.

124. **Zuckerman JE, Gritli I, Tolcher A.** Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 05 08 2014, Vol. 111, 31, pp. 11449-11454.

125. **Schultheis B, Strumberg D, Santel A.** First-in-Human Phase I Study of the Liposomal RNA Interference Therapeutic Atu027 in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 17 11 2014, Vol. 32, 36, pp. 4141-4148.

126. **Schultheis B, Strumberg D, Traugott U.** Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 01 2012, Vol. 50, 1/2012, pp. 76-78.

127. **RK, Jain.** Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. *Journal of Clinical Oncology*. 10 06 2013, Vol. 31, 17, pp. 2205-2218.

128. Atu027 Plus Gemcitabine in Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer (Atu027-I-02) (Atu027-I-02). *ClinicalTrials.gov*. [En ligne] [Citation : 03 02 2017.] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01808638?term=atu027&rank=1>.

129. **Zuckerman JE, David ME.** Clinical experiences with systematically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12 2015, Vol. 14, 12, pp. 843-856.

130. **X, Liu.** Targeting Polo-Like Kinases: A Promising Therapeutic Approach for Cancer Treatment. *Translational Oncology*. 06 2015, Vol. 8, 3, pp. 185-195.

131. *A Phase I dose escalation study of TKM-080301, a RNAi Therapeutic directed against PLK1, in patients with advanced tumors.* **Ramanathan RK, Hamburg SI, Borad MJ.** Washington, DC : s.n., 2013. AACR Annual Meeting. pp. 1-18.

132. **Biopharma, Arbutus.** TKM-PLK1. [En ligne] [Citation : 10 02 2017.] <http://arbutusbio.com/portfolio/tkm-plk1.php>.

133. **Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM.** First-in-Man Trial of an RNA Interference Therapeutic Targeting VEGF and KSP in Cancer Patients with Liver Involvement. *Cancer Discovery*. 04 2013, Vol. 3, 4, pp. 406-417.

134. **Wu SY, Lopez-Berestein G, Calin GA.** RNAi Therapies : Drugging the Undruggable. *Science Translational Medicine*. 11 06 2014, Vol. 6, 240.

135. International Cancer Genome Consortium. [En ligne] [Citation : 28 05 2017.] <http://www.icgc.org/>.

136. Nanoparticle Pubmed. *PubMed*. [En ligne] [Citation : 12 06 2017.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=nanoparticle>.

137. **Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A.** Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature biotechnology*. 07 2013, Vol. 31, 7, pp. 638-646.

138. **Shi J, Kantoff PW, Wooster R.** Cancer nanomedicine : progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*. 01 2017, Vol. 17, pp. 20-37.

139. **Goldberg, MS.** siRNA delivery for the treatment of ovarian cancer. *Methods*. 15 09 2013, Vol. 63, 2, pp. 95-100.

140. **Golan T, Khvalevsky EZ, Hubert A.** RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients. *Oncotarget*. 15 09 2015, Vol. 6, 27, pp. 24560-24570.

141. **Beg MS, Borad M, Sachdev J.** Multicenter phase I study of MRX34, a first-in-class microRNA miR-34 mimic liposomal injection. *Proceedings : AACR Annual Meeting*. 10 2014, Vol. 74, 19.

142. **therapeutics, miRNA.** Mirna Therapeutics Halts Phase 1 Clinical Study of MRX34. [En ligne] 09 20 2016. [Citation : 02 05 2017.] <http://investor.mirnarx.com/releasedetail.cfm?releaseid=990204>.

143. **Schwarz, Dianne S. et al.** Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*. 17 Oct. 2003, Vol. 115, pp. 199-208.

144. **Moghaddam B, McNeil S E, Zeng Q.** Exploring the Correlation Between Lipid Packaging in Lipoplexes and Their Transfection Efficacy. *Pharmaceutics*. 12 2011, Vol. 3, pp. 848-864.

145. **Janko C, Dürr S, Munoz L E.** Magnetic Drug Targeting Reduces the Chemotherapeutic Burden on Circulating Leukocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2 04 2013, Vol. 14, pp. 7341-7355.

146. SiDirect. [En ligne] siDirect version 2.0.

147. siDESIGN Center. *Dharmacon, RNAi, Gene Expression & Gene Editing*. [En ligne] <http://dharmacon.gelifesciences.com/design-center/>.

148. **Esquela-Kerscher A, Slack J.** Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 04 2006, Vol. 6, pp. 259-269.

149. **Xu C, Wang J.** Delivery system for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 02 2015, Vol. 10, 1, pp. 1-12.

150. **Mok H, Lee SH, Park JW.** Multimeric small interfering ribonucleic acid for highly efficient sequence-specific gene silencing. *Nature Materials*. 03 2010, Vol. 9, pp. 272-278.

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE L'UFR

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.