

2017-2018

Thèse

pour le

Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

**Interférence ARN : utilisation
thérapeutique et vectorisation**

--

***ARN interference: therapeutic use and
vectorization***

Boudaud David |

Né le 16 octobre 1989 à La Roche sur Yon (85)

Sous la direction de Mme Roger Emilie et de M. Lagarce Frederic |

Membres du jury

| Président : M. Saulnier Patrick

| Directeur : Mme Roger Emilie

| Co-Directeur : M. Lagarce Frederic

| Membre : Mme David Stephanie

Soutenue publiquement le :

23 novembre 2018 à 14h



■ UFR SANTÉ

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné David Boudaud
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le 31/08/2018

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Boudaud', with a stylized flourish extending from the end.

Liste des enseignants de l'UFR Santé d'Angers

Directeur de l'UFR : Pr Nicolas Lerolle

Directeur adjoint de l'UFR et directeur du département de pharmacie : Pr Frédéric Lagarce

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUDRAN Maurice	Rhumatologie	Médecine
AZZOUZI Abdel Rahmène	Urologie	Médecine
BARON-HAURY Céline	Médecine générale	Médecine
BARTHELAIX Annick	Biologie cellulaire	Médecine
BATAILLE François-Régis	Hématologie ; transfusion	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BEAUCHET Olivier	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BEYDON Laurent	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
BIZOT Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CAILLIEZ Eric	Médecine générale	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CHABASSE Dominique	Parasitologie et mycologie	Médecine
CHAPPARD Daniel	Cytologie et histologie	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
COUTURIER Olivier	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DARSONVAL Vincent	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
DE BRUX Jean-Louis	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
ENON BeARNrd	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FANELLO Serge	Épidémiologie ; économie de la santé et prévention	Médecine
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GARNIER François	Médecine générale	Médecine
GARRE Jean-BeARNrd	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GRANRY Jean-Claude	Anesthésiologie-réanimation	Médecine

GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILET David	Chimie analytique	Pharmacie
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HUEZ Jean-François	Médecine générale	Médecine
HUNAUT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JARDEL Alain	Physiologie	Pharmacie
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
JOLY-GUILLOU Marie-Laure	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LAUMONIER Frédéric	Chirurgie infantile	Médecine
LEFTHERIOTIS Georges	Physiologie	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
MERCIER Philippe	Anatomie	Médecine
MILEA Dan	Ophtalmologie	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie mycologie	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PICHARD Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROHMER Vincent	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET M.-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique	Médecine
SAINT-ANDRE Jean-Paul	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique pharmaceutique et biostatistique	Pharmacie
SENTILHES Loïc	Gynécologie-obstétrique	Médecine
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
SUBRA Jean-François	Néphrologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VENIER Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie

VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
ZAHAR Jean-Ralph	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
ZANDECKI Marc	Hématologie ; transfusion	Médecine

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANNAIX Véronique	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
BAGLIN Isabelle	Pharmaco-chimie	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELLANGER William	Médecine générale	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie et pharmacocinétique	Pharmacie
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHEVAILLER Alain	Immunologie	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie	Pharmacie
CRONIER Patrick	Chirurgie orthopédique et traumatologique	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine générale	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FLEURY Maxime	Immunologie	Pharmacie
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
JEANGUILLAUME Christian	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
LANDREAU Anne	Botanique	Pharmacie
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Valorisation des substances naturelles	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale Nanovectorisation	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique et bromatologie	Pharmacie

MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	Médecine
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et santé au travail	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistique	Pharmacie
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SIMARD Gilles	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
TANGUY-SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TRICAUD Anne	Biologie cellulaire	Pharmacie
TURCANT Alain	Pharmacologie	Médecine
<u>AUTRES ENSEIGNANTS</u>		
AMIARD Stéphane	Informatique	Médecine
AUTRET Erwan	Anglais	Médecine
BRUNOIS-DEBU Isabelle	Anglais	Pharmacie
CAVAILLON Pascal	Pharmacie Industrielle	Pharmacie
CHIKH Yamina	Économie-Gestion	Médecine
FISBACH Martine	Anglais	Médecine
LAFFILHE Jean-Louis	Officine	Pharmacie
LETERTRE Elisabeth	Coordination ingénierie de formation	Médecine
O'SULLIVAN Kayleigh	Anglais	Médecine

Remerciements

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Patrick Saulnier,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je tiens aussi à mettre en avant la qualité et la richesse de vos nombreux enseignements durant mes études.

À Madame le Docteur Emilie Roger,

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de diriger ce travail, et vous remercie pour vos nombreux conseils, tous pertinents, qui ont permis l'aboutissement de ce mémoire.

À Monsieur le Doyen de Pharmacie et Professeur Frederic Lagarce,

Je vous remercie d'avoir accepté de codiriger ce travail, et vous suis très reconnaissant pour votre investissement personnel qui a rendu possible la reprise de ma thèse sur un nouveau sujet. Par ailleurs, je tiens à souligner la qualité de vos enseignements durant mes études. Enfin, je tiens à saluer votre bienveillance et vos nombreux conseils avisés dispensés au cours de ma longue formation, notamment lorsque j'évoluais en filière recherche.

À Madame le Docteur Stephanie David,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse ainsi que de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je garde un souvenir de chacune des nombreuses personnes rencontrées au cours des différents stages qui ont enrichi ma formation, que ce soit en officine ou en labo de recherche. Je pense en particulier à Madame Anne Guérin, chez laquelle j'ai effectué mes différents stages en officine, et à Madame Anne Sapin-Minet, qui m'a encadré en stage recherche à Nancy.

Dans le cadre professionnel, j'ai aussi une petite pensée pour mes collègues de l'ICO qui auront fait partie intégrante de mon quotidien ces 18 derniers mois. Vous avez rendu cette expérience professionnelle positive et riche d'enseignements pour mon futur.

Un grand merci à mes amis des années de faculté, pour votre soutien et tous ces souvenirs partagés, par la suite. Je pense en particulier à Jeremy, Guillaume, Philippe, Rémy et Jérémie.

Enfin, je remercie mes parents, mon frère, ma sœur, mais aussi les membres de ma famille (en particulier ceux dont la vie a pris fin ces dernières années), et toutes les personnes de mon entourage, pour leurs valeurs, leurs encouragements, et leur soutien inconditionnel durant mon long périple d'étudiant.

Table des matières

Liste des enseignants de l'UFR Santé d'Angers	3
Remerciements	7
Table des matières	8
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Liste des abréviations	15
Introduction générale	17
Première partie : interférence ARN, du mécanisme naturel à l'outil pour la recherche	20
Section I : Historique et mécanismes fondamentaux de l'interférence ARN	20
1. Historique de l'interférence ARN	20
2. Mécanismes fondamentaux de l'interférence ARN	22
2.1. siARN	22
2.1.1. Biosynthèse	23
2.1.1.1. Complexe Dicer-TRBP	24
2.1.1.2. RNA-Induced Silencing Complex	26
2.1.2. Mécanisme d'action	27
2.2. miARN	28
2.2.1. Biosynthèse	29
2.2.1.1. Phase nucléaire	31
2.2.1.2. Phase cytoplasmique	34
2.2.2. Mécanisme d'action	35
2.3. piARN	37
Section II : Conséquences pratiques pour la conception d'un siARN	39
1. Influence des propriétés intrinsèques du siARN	39
1.1. Influence de la séquence et des propriétés thermodynamiques	39
1.2. Influence de la séquence et de la conformation dans l'espace	41
1.3. Influence de la taille du siARN	41
2. Limites imposées par le transcrit cible	42
Section III : Interférence ARN : un mécanisme aux multiples intérêts	44
1. Un outil pour la compréhension de la fonction des gènes	45

1.1.	Un intérêt pour le diagnostic précoce : la recherche de biomarqueurs	45
1.1.1.	Définition	45
1.1.2.	La recherche de marqueurs biologiques dans les faits	46
1.2.	Un intérêt pour préparer une approche curative : la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.....	47
1.2.1.	Définition	47
1.2.2.	La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les faits.....	47
2.	Un outil pour de nombreuses applications en thérapeutique	48
2.1.	Maladies virales.....	48
2.2.	VIH.....	49
2.3.	Cancers	49
2.4.	Autres maladies.....	50
3.	Conclusion.....	50
Section IV : Induction de l'ARNi, contraintes associées à la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques		51
1.	La stabilité des ARN interférents	52
2.	La biodistribution.....	53
2.1.	Une distribution non-spécifique	53
2.2.	L'internalisation.....	54
2.3.	L'accessibilité du compartiment cytoplasmique	56
2.3.1.	Échappement endosomal par « appariement ionique »	57
2.3.2.	Échappement endosomal par « effet pompe à protons »	58
2.4.	Les effets secondaires potentiellement néfastes liés à l'utilisation des ARN interférents ...	59
2.4.1.	L'induction possible de réponses immunitaires	59
2.4.2.	Les effets aspécifiques.....	60
2.4.3.	La saturation des voies endogènes.....	62
3.	Conclusion sur l'induction de l'ARNi de façon exogène	62
<u>Deuxième partie : « De la seringue à la cellule », galénique de l'interférence ARN.....</u>		64
Introduction de la deuxième partie.....		64
1.	Les méthodes de transfection physiques et chimiques.....	66
1.1.	Les méthodes physiques	66
1.1.1.	Méthode par perturbation des membranes plasmiques	66
1.1.2.	Biolistique.....	70
1.1.3.	Micro-injection	70
1.1.4.	Conclusion sur les modifications physiques	71

1.2.	Les méthodes chimiques	71
1.2.1.	Modifications intrinsèques des siARN	72
1.2.1.1.	Chimie sur le groupement phosphate	72
1.2.1.2.	Chimie sur le ribose	74
1.2.2.	Conjugaison à d'autres molécules	75
1.2.2.1.	Groupements lipophiles	75
1.2.2.2.	Groupements aptamères	77
1.2.2.3.	Groupements peptidiques	78
1.2.3.	Conclusion sur les modifications chimiques	78
1.3.	Conclusion sur les transfection physiques et chimiques	79
2.	Les nanovecteurs pour la transfection des ARN interférents	80
2.1.	Définition	80
2.2.	Objectifs de la vectorisation	80
2.3.	Les vecteurs viraux pour la transfection des ARN interférents	81
2.3.1.	Les différentes classes de vecteurs viraux	82
2.3.1.1.	Rétrovirus	82
2.3.1.2.	Lentivirus	83
2.3.1.3.	Adénovirus	83
2.3.1.4.	Virus adéno-associé (VAA)	84
2.3.1.5.	Baculovirus	85
2.3.2.	Conclusion sur les vecteurs viraux	85
2.4.	Les vecteurs synthétiques pour la transfection des ARN interférents	87
2.4.1.	Généralités sur les vecteurs synthétiques	87
2.4.2.	Propriétés physico-chimiques des nanovecteurs d'ARN interférents	89
2.4.2.1.	Influence de la taille des nanovecteurs	90
2.4.2.2.	Influence de la charge de surface	90
2.4.3.	Les différentes classes de vecteurs synthétiques	91
2.4.3.1.	Les vecteurs inorganiques	91
2.4.3.2.	Les vecteurs organiques	93
2.4.3.2.1.	Les vecteurs de nature polymérique	93
2.4.3.2.2.	Les vecteurs de nature peptidique	103
2.4.3.2.3.	Les vecteurs de nature lipidique	112
	Conclusion de la deuxième partie	126
<u>Troisième partie : Médicaments utilisant l'interférence ARN, qui sont-ils et quels essais cliniques pour le marché pharmaceutique en 2018 ?</u>		<u>127</u>
1.	Généralités	127
1.1.	Les différentes phases en essais cliniques	127
1.2.	L'essor de l'ARN interférence en essais cliniques	129

2.	Principaux siARN en course dans les essais cliniques	132
2.1.	Principaux siARN testés en ophtalmologie	133
2.1.1.	Pf-04523655 (Pf-655).....	133
2.1.2.	QPI-1007	135
2.1.3.	SYL040012 (Bamosiran)	137
2.1.4.	SYL1001	139
2.2.	Principal siARN testé en néphrologie : QPI-1002 (I5NP).....	141
2.3.	Principaux siARN testés en cancérologie	143
2.3.1.	TKM-080301 (TKM-PLK1).....	143
2.3.2.	Atu027	145
2.3.3.	siG12D-LODER.....	146
2.4.	Principal siARN testé contre certaines formes d'amylose : ALN-TTR02 (Patisiran)	148
3.	Principaux miARN en course dans les essais cliniques.....	150
4.	Conclusion.....	154
<u>Conclusion générale.....</u>		155
<u>Annexes.....</u>		157
<u>Bibliographie.....</u>		172

Liste des figures

Figure 1 : phénotypes de la plante sauvage et des plantes transgéniques obtenus suite à l'introduction du gène *Chs*

Figure 2 : la voie des siARN

Figure 3 : structure de Dicer

Figure 4 : structure de TRBP

Figure 5 : structure d'un siARN

Figure 6 : structure des protéines Ago chez l'Homme

Figure 7 : ARN issus du gène *lin-4* et complémentarité avec l'ARNm de *lin-14*

Figure 8 : voie d'extinction post-transcriptionnelle médiée par les miARN

Figure 9 : phase nucléaire de la biosynthèse des miARN

Figure 10 : structures de DROSHA et DGCR8 chez l'Homme

Figure 11 : fixation du microprocesseur nucléaire sur le pri-miARN

Figure 12 : voie d'inhibition de la traduction GW 182-dépendante

Figure 13 : voie d'inhibition de la traduction GW182-indépendante

Figure 14 : voie des piARN et phénomène "ping pong"

Figure 15 : modèle expliquant les pertes d'efficacité des siARN

Figure 16 : principe de la découverte de biomarqueurs

Figure 17 : représentation des différentes barrières fréquemment rencontrées pour un ARN interférent depuis son point d'administration en intraveineuse jusqu'à son éventuel échappement endosomal

Figure 18 : les nucléotides composant les siARN

Figure 19 : de l'internalisation par endocytose à la dégradation lysosomale

Figure 20 : les mécanismes d'échappement endosomal

Figure 21 : effets spécifiques et aspécifiques des siARN

Figure 22 : les différents obstacles à la délivrance de siARN

Figure 23 : principe de l'électroporation

Figure 24 : principe de la sonoporation

Figure 25 : amélioration de la délivrance des siARN

Figure 26 : modifications chimiques introduites dans les siARN

Figure 27 : conjugaison à un groupement lipophile

Figure 28 : conjugaison à la vitamine E

Figure 29 : évolution du nombre de publications se rapportant à l'utilisation de particules non-virales pour la transfection de siARN

Figure 30 : facteurs influençant la biodistribution des nanovecteurs

Figure 31 : revêtement de surface des particules inorganiques

Figure 32 : formules du PEI et nanosphères de PEI

Figure 33 : représentation de l'effet « parapluie » induit par l'étalement du polymère

Figure 34 : structure d'un dendrimère de type PAMAM

Figure 35 : structure chimique du PLGA

Figure 36 : fonctionnement des poly-conjugués dynamiques

Figure 37 : schéma de la structure de la cyclodextrine beta

Figure 38 : structure du chitosane

Figure 39 : pour la délivrance de siARN, conception d'une NP de ciblage tumoral à l'aide de PPC permettant d'améliorer l'absorption cellulaire et l'échappement endosomal de la NP

Figure 40 : mécanisme d'internalisation des peptides cationiques

Figure 41 : mécanisme d'internalisation des peptides amphiphiles

Figure 42 : représentation tridimensionnelle des liposomes

Figure 43 : représentation de la structure des lipides utilisés pour former les liposomes

Figure 44 : schéma des lipoplexes sous forme de feuillet

Figure 45 : exemple d'un lipidoïde, le 98N12-5(1)

Figure 46 : représentation d'une particule lipidique de type SNALP

Figure 47 : schéma d'une nanoparticule lipidique cationique et de sa complexation avec les siARN

Figure 48 : étapes du procédé standard de formulation des nanocapsules lipidiques avec encapsulation d'un médicament lipophile

Figure 49 : indications des siARN et miARN

Figure 50 : liste des sociétés biopharmaceutiques développant des thérapies à base de miARN et siARN

Figure 51 : différentes molécules de siARN testées dans des essais cliniques et leur état d'avancement

Figure 52 : différentes molécules de miARN testées en préclinique et dans des essais cliniques, avec leur état d'avancement

Liste des tableaux

Tableau 1 : exemples de miARN impliqués dans la différenciation cellulaire

Tableau 2 : comparaison des méthodes de transfection physiques et chimiques

Tableau 3 : caractéristiques des vecteurs viraux

Tableau 4 : comparaison des différentes classes de vecteurs polymériques

Tableau 5 : comparaison de trois grandes classes de vecteurs synthétiques

Tableau 6 : synthèse des différents lipides cationiques utilisés pour la formation des lipoplexes : description, exemple et structure

Tableau 7 : comparaison des différents vecteurs synthétiques lipidiques utilisés pour la transfection des ARN interférents

Tableau 8 : les phases successives de recherche et de développement d'un médicament

Liste des abréviations

ARNdb	ARN double brin
ARNi	Interférence ARN
ARNm	ARN messenger
ATTR	amylose de la transthyrétine
CGR	cellules ganglionnaires rétiniennes
CHS	chalcone synthase
DGCR8	DiGeorge Critical Region 8
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
DOPE	1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine
DOTAP	1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane
FDA	Food and Drug Administration
GFP	green fluorescent protein
HA	humeur aqueuse
IRA	insuffisance rénale aiguë
IV	intraveineuse
IVT	intravitréenne
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LNA	locked nucleic acid
LODER	<u>L</u> Ocal <u>D</u> rug <u>E</u> lute <u>R</u>
miARN	MicroARN
NCL	nanocapsules lipidiques
NOIAN	neuropathie optique ischémique antérieure non artéritique
NP	nanoparticules
NPLc	nanoparticule lipidique cationique
PABP	PolyAdenylate Binding Protein
PAMAM	poly-amidoamine
PAZ	PIWI Argonaute Zwillle
PEG	polyéthylène glycol
PEI	polyéthylène-imine
piARN	piwi interacting ARN
PIO	pression intraoculaire
PKN3	protéine kinase N3
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
PLK1	polo-like kinase 1
PPC	peptides de pénétration cellulaire
pre-miARN	microARN precursor
pri-miARN	microARN primary
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigen
PTGS	post transcriptionnal gene silencing
QD	quantum dots
R&D	Recherche et Développement

RISC	ARN induce silencing complex
RLC	ARN Loading Complex
saARN	small activating ARN
shARN	short hairpin ARN
siARN	small interfering ARN
SNALP	Stable Nucleic Acid Lipid Particle
TLR	Toll-like receptor
TRBP	Trans-activation response ARN Binding Protein
TRPV1	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
TTR	transthyréline
VAA	virus adéno-associé
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHC	virus de l'hépatite C

Introduction générale

Des maladies humaines comme le SIDA ou les hépatites virales, les cancers, ou encore les maladies héréditaires et orphelines, présentent toutes des défis pour la médecine. L'arsenal thérapeutique actuel est essentiellement constitué de molécules ciblant les protéines, lipides ou sucres, sans spécificité étroite, et dont l'élaboration est longue et aléatoire. Aujourd'hui, les thérapies géniques sont encore très peu développées et, il y a encore 10 ans, il pouvait sembler impossible de modifier le fonctionnement des gènes sans procéder à de complexes manipulations du matériel génétique. En outre, ce genre de procédé était réservé aux cellules souches embryonnaires et était donc inapplicable à la médecine du quotidien ¹.

L'interférence ARN (*ARNi*) a apporté un regard différent à la fois sur les mécanismes de régulation cellulaire et sur les thérapies du futur. Le processus de l'*ARNi*, ancien mais très conservé chez les eucaryotes, serait un système de défense et de maintien de l'intégrité du génome, permettant de lutter contre les infections virales ou les transposons. En 2006, le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine a été décerné à Andrew Fire et Craig Mello pour la mise en exergue de ce mécanisme. Depuis 1998, cette découverte a suscité un véritable engouement au sein de la communauté scientifique. A l'inverse des molécules usuelles, et grâce à l'introduction d'ARN double brin (*ARNdb*) dans les cellules, il est possible *via* l'*ARNi* d'inhiber sélectivement l'expression des gènes, et ce à un niveau post-transcriptionnel ². De plus, à l'inverse de certaines thérapies géniques, l'*ARNi* peut fonctionner sur un être vivant. Comme il s'agit d'épigénétique, l'information génétique dans le génome n'est pas modifiée, autrement dit il n'y a pas de mutations provoquées de la séquence d'ADN, et seule l'activité de quelques gènes est changée. Ce mécanisme met en jeu de petits ARN interférents double brin, notamment des siARN (*small interfering*

ARN), qui vont s'associer à un complexe enzymatique intracellulaire afin de dégrader l'ARN messager (ARNm) de séquence complémentaire ¹⁻³.

L'ARNi représente une méthode de premier ordre pour étudier la fonction des gènes, pour valider de potentielles cibles thérapeutiques ou même pour développer de nouvelles thérapeutiques, par exemple dans les domaines de l'oncologie ou de la virologie. Compte tenu du caractère naturel de ce mécanisme, et comme précisé ci-dessus, il se révèle très efficace pour inhiber l'expression des gènes, bien plus que les outils précédemment développés, tels que les stratégies antigènes ou antisens. Afin de mettre en œuvre le processus d'ARNi dans les cellules, il est possible de recourir soit à des vecteurs plasmidiques exprimant des ARN double brin, soit directement à des ARN interférents. Dans le premier cas, on retrouve les inconvénients de la thérapie génique (transfert d'ADN), à savoir la vectorisation de l'ADN jusque dans le noyau. La seconde option est souvent privilégiée puisque les siARN ne nécessitent une délivrance que jusqu'au niveau du cytosol, leur lieu d'action ^{1,2}.

Malgré tout, le problème de la délivrance reste un obstacle majeur à l'utilisation courante de l'ARNi. Pour des applications thérapeutiques chez l'Homme, sont principalement rencontrés avec les siARN des problèmes de stabilité, de biodistribution, de ciblage, de pénétration cellulaire, ou d'induction d'éventuels effets secondaires, notamment d'ordre immunologique. Tous ces inconvénients obligent le recours à des systèmes d'administration et de transport innovants afin de faciliter, entre autres, la pénétration cellulaire des acides nucléiques ². C'est là qu'intervient la vectorisation, technologie qui consiste à moduler et contrôler la distribution d'un principe actif vers une cible en l'associant à un vecteur, celui-ci faisant office de transporteur. La vectorisation peut, par exemple, avoir des applications en cosmétique, dans les thérapies anti-cancer, la thérapie génique, ou encore la vaccination. Le système de vectorisation le plus courant repose sur l'usage des virus recombinants. Ces vecteurs sont donc de nature virale. Cependant, et bien que très efficaces, les méthodes virales destinées à l'administration thérapeutique des acides nucléiques sont très souvent associées à des phénomènes d'immunogénicité et de tumorigénicité ^{1,2,4}. *A contrario*, les vecteurs synthétiques, de nature non virale, sont traditionnellement moins efficaces, mais peuvent être indiqués en lieu et place des

vecteurs viraux afin d'éviter les problèmes typiques de ceux-ci, ainsi que pour augmenter l'incorporation des ARN dans les cellules ^{1,2,5}.

L'intérêt suscité par le mécanisme d'ARNi et les efforts de recherche des scientifiques ont d'ores et déjà permis de développer des thérapeutiques aujourd'hui évaluées sur l'Homme dans des essais cliniques ². Le but de ce mémoire est donc de proposer une revue détaillée des mécanismes de l'ARNi et de ses applications thérapeutiques en médecine humaine, *via* l'usage ou non de systèmes de transfection innovants. Dans la première partie seront rappelés les mécanismes fondamentaux de l'ARNi et sera dressé un portrait des différents types d'ARN interférents isolés à ce jour. Aussi seront expliquées les modalités théoriques de conception d'un siARN, tout comme les contraintes associées à la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques. Dans la deuxième partie seront détaillés les outils disponibles pour la transfection des ARN interférents. Enfin dans la troisième partie seront passés en revue les essais cliniques testant des thérapies utilisant l'ARNi.

Première partie : interférence ARN, du mécanisme naturel à l'outil pour la recherche

Section I : Historique et mécanismes fondamentaux de l'interférence ARN

L'interférence ARN (*ARNi*) est un mécanisme de défense cellulaire déclenché par l'introduction d'ARN double brin (*ARNdb*) dans la cellule. Il s'agit d'un système d'extinction de l'expression d'un gène par inhibition du processus post-transcriptionnel (*post transcriptionnal gene silencing* ou *PTGS*). Andrew Z. Fire et Craig C. Mello ont reçu le 2 octobre 2006 le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux concernant cette découverte ⁶.

1. Historique de l'interférence ARN

Le phénomène d'ARNi a été découvert de manière fortuite par des botanistes travaillant sur les mécanismes moléculaires de la coloration des fleurs de pétunia (Figure 1). En 1990, Jorgensen cherche à intensifier la couleur des pétunias en ajoutant par transgénèse au génome de la plante des copies supplémentaires du gène de la chalcone synthase (*CHS*), responsable de la coloration des fleurs. Contre toute attente, il observe que les fleurs obtenues sont soit entièrement blanches, soit décolorées, soit blanches mouchetées de violet. L'excès du gène et par conséquent de l'ARN messager (*ARNm*) codant pour la CHS avait provoqué chez la plante hôte

un phénomène correcteur qui consistait à rendre silencieux non seulement l'ADN injecté mais aussi l'ADN endogène codant pour la CHS. Le phénomène fut alors qualifié de « co-suppression » ⁷.



Fleur sauvage

*Fleur obtenue après
introduction du transgène*

*Fleur obtenue après
introduction du transgène*

Figure 1 : phénotypes de la plante sauvage et des plantes transgéniques obtenus suite à l'introduction du gène Chs ⁶.

En 1998, ce phénomène fut à nouveau observé dans le règne animal par les études menées par le groupe d'Andrew Fire chez le nématode *Caenorhabditis elegans* ^{8,9}. Identifié sous le nom de post transcriptionnal gene silencing (*PTGS*) chez les plantes, ce mécanisme d'extinction de l'expression d'un gène par l'introduction d'ARN homologue, fut alors appelé interférence ARN. L'équipe d'Andrew Fire a montré que l'introduction d'ARN dans des cellules pouvait interférer avec la fonction d'un gène endogène et réduire spécifiquement l'expression des protéines.

Jusqu'en 2001, toutes les tentatives pour transposer cet outil dans les cellules de mammifères se sont révélées infructueuses. En effet, chez les mammifères, l'introduction d'un long ARN double-brin (*ARNdb*) déclenche une forte réaction antivirale non spécifique, appelée réponse interféron. Les cellules détectent l'ARN viral grâce à des senseurs cytoplasmiques et membranaires, ce qui entraîne une production d'interféron de type 1. Deux mécanismes interviennent dans cette réponse : l'induction de la 2'-5' adénylate synthétase et l'activation de la protéine kinase PKR. L'activation de ces voies bloque la synthèse des protéines cellulaires et provoque une dégradation non spécifique des ARNm. En 2001, l'équipe d'Elbashir et

Tuschl a montré que l'introduction dans les cellules de mammifères de petits ARNdb de séquence homologue à celle d'un ARN endogène conduisait à la dégradation de ce dernier sans déclencher la production d'interféron ¹⁰. La taille de ces oligoribonucléotides correspond à celle des produits de clivage des grands ARNdb observés chez les plantes lors du processus d'ARNi. Ces oligonucléotides, d'une taille de l'ordre d'une vingtaine de nucléotides, sont maintenant appelés small interfering RNA (*siARN* en français). Ce mécanisme d'extinction de l'expression d'un gène par des ARNdb a donc été retrouvé à la fois chez les mammifères, les plantes et les eucaryotes, et atteste d'un mécanisme très conservé ¹¹.

2. Mécanismes fondamentaux de l'interférence ARN

2.1. *siARN*

Les *siARN* sont de petits ARNdb pouvant provenir de précurseurs endogènes (« *endosiARN* ») ou exogènes. Les *siARN* endogènes ont d'abord été mis en évidence chez *Caenorhabditis elegans* et chez certaines plantes. Ils apparaissent comme les produits finaux de l'action catalytique d'ARN polymérase ARN dépendante, capables de synthétiser de longs ARNdb, les *endosiARN*, au sein du noyau. Ces derniers seront ensuite exportés vers le cytoplasme pour être pris en charge par la ribonucléase Dicer. Le rôle des *siARN* a d'abord été observé chez les plantes comme réponse à un stress ou comme mécanisme de défense contre les virus ¹².

Chez les mammifères, l'absence d'ARN polymérase ARN dépendante semblait écarter l'hypothèse de la présence d'*endosiARN* jusqu'à la découverte de séquences d'ADN endogènes répétées et dispersées, les rétrotransposons. Ces derniers sont capables de synthétiser un ARN bidirectionnel en utilisant un promoteur dans les orientations sens et antisens. Les *endosiARN* sont issus majoritairement de régions comportant des répétitions inversées en tandem, permettant la formation de structures intramoléculaires au sein des longs ARNdb formés. Leur rôle est encore mal connu mais ils pourraient lutter contre les infections virales et être impliqués dans la défense contre les transposons ¹³.

Les précurseurs de siARN 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 ¹².

2.1.1. Biosynthèse

Les longs ARNdb précurseurs des siARN, dont les deux brins sont appariés de manière parfaitement complémentaire, et qu'ils soient endogènes ou exogènes, sont retrouvés dans le cytoplasme. Ils sont incorporés dans le complexe Dicer-TRBP (*Trans-activation response ARN Binding Protein*) et clivés en petits ARNdb de 19 à 22 nucléotides, ayant une extrémité 3' hydroxylée avec deux nucléotides non appariés et une extrémité 5' phosphorylée. Ces petits ARNdb correspondent aux « small interfering RNA ». Ensuite, ces siARN vont être intégrés au « RNA-Induced Silencing Complex » (*RISC*) pour pouvoir interagir avec l'ARNm cible (Figure 2) ¹⁴.

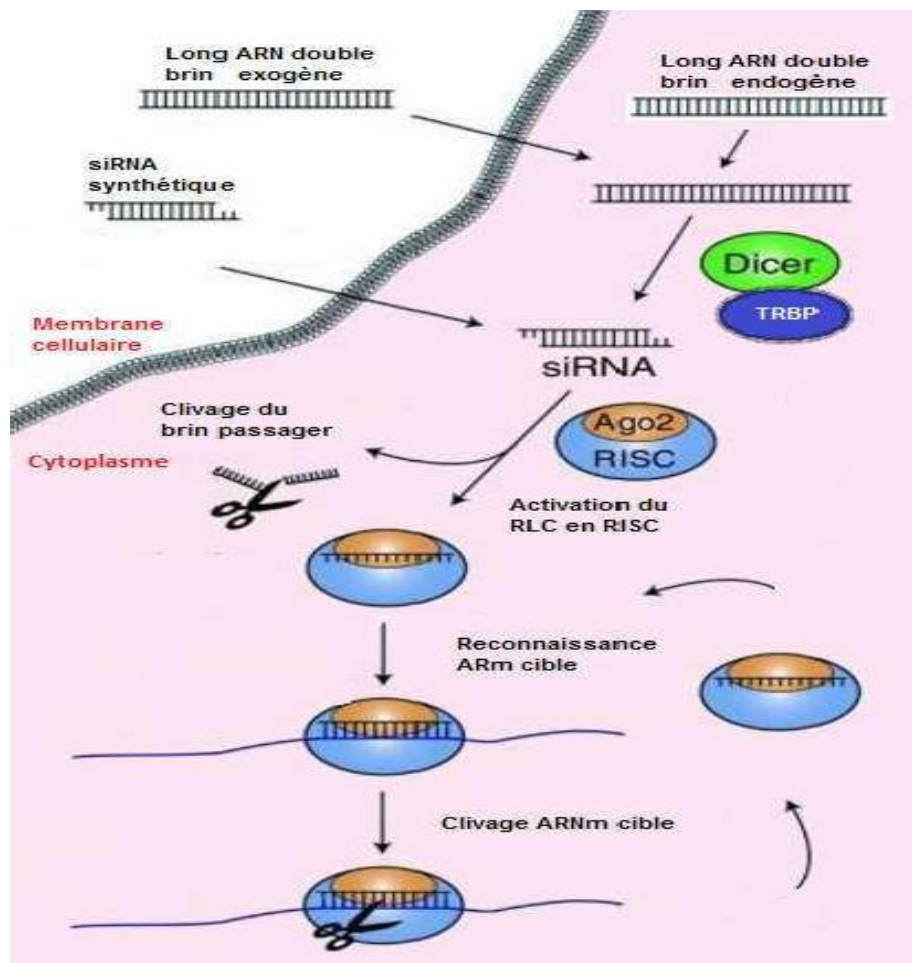


Figure 2 : la voie des siARN ¹².

2.1.1.1. Complexe Dicer-TRBP

Dicer (Figure 3) est une ribonucléase 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 ¹⁴ :

- d'un domaine nommé PIWI Argonaute Zwiller (*PAZ*),
- 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).

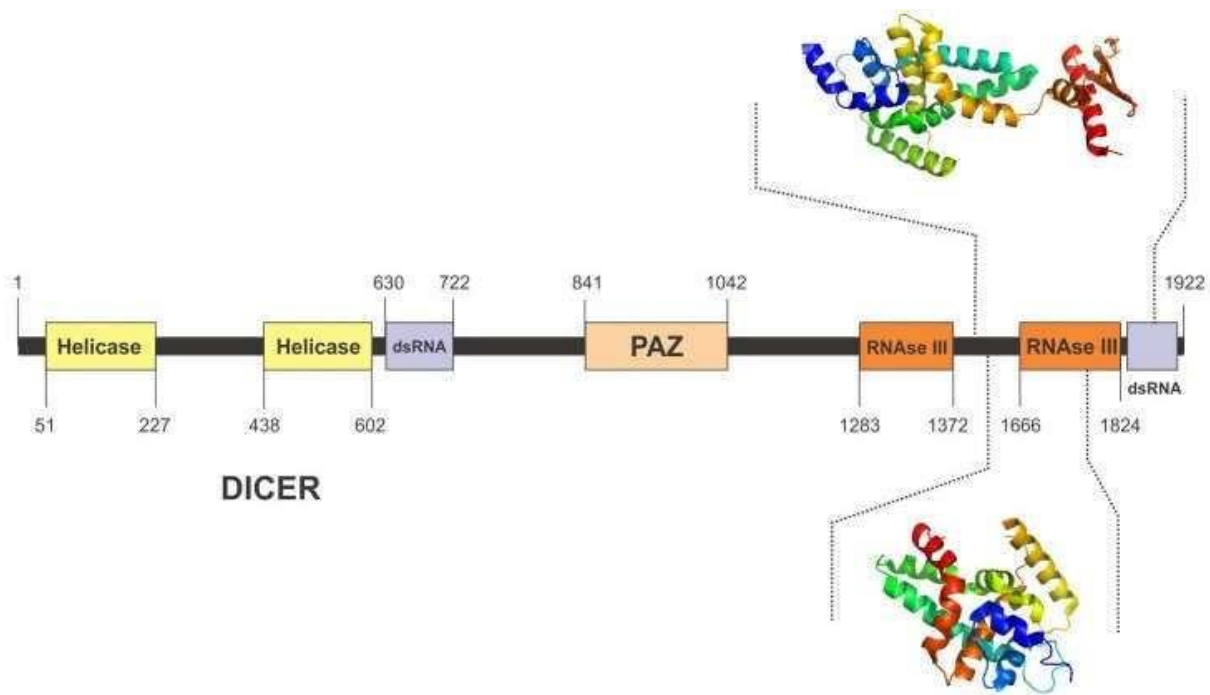


Figure 3 : structure de Dicer ¹⁴.

TRBP (*Trans-activation response ARN Binding Protein*, Figure 4) est une protéine de liaison à l'ARN double brin se composant ¹⁵ :

- 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.

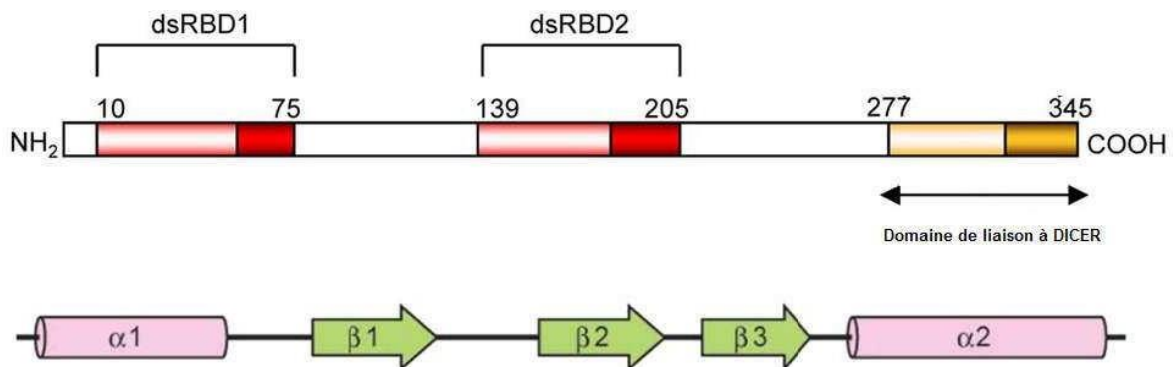


Figure 4 : structure de TRBP ¹⁶.

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 siARN et micro-ARN (*miARN*) 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 ¹⁶.

Les deux domaines catalytiques ribonucléases IIIa et IIIb de Dicer abritent deux sites actifs et une poche chargée positivement de par la présence de résidus Lysine permettant d'accueillir une chaîne longue d'ARNdb. 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 siARN ¹⁷. Ces deux domaines ribonucléases III situés en vis-à-vis avec un décalage clivent les précurseurs de siARN en siARN double brin d'environ 21 nucléotides. Ces siARN possèdent deux nucléotides non appariés en leur extrémité 3' (Figure 5).

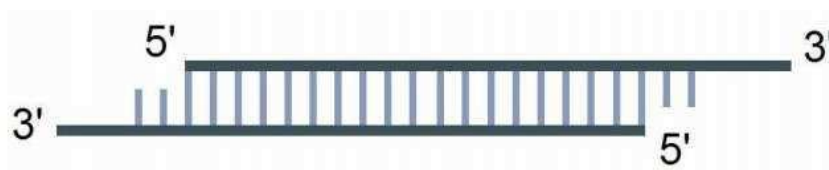


Figure 5 : structure d'un siARN ¹⁰.

Les siARN 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 siARN. 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 ¹².

2.1.1.2. RNA-Induced Silencing Complex

Le RISC se forme dans un premier temps par recrutement d'une protéine Argonaute *via* le complexe Dicer-TRBP ¹⁵. Les protéines Argonaute appartiennent à une grande famille de protéines de liaison à l'ARN (Figure 6).

Elles se composent ¹⁴ :

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

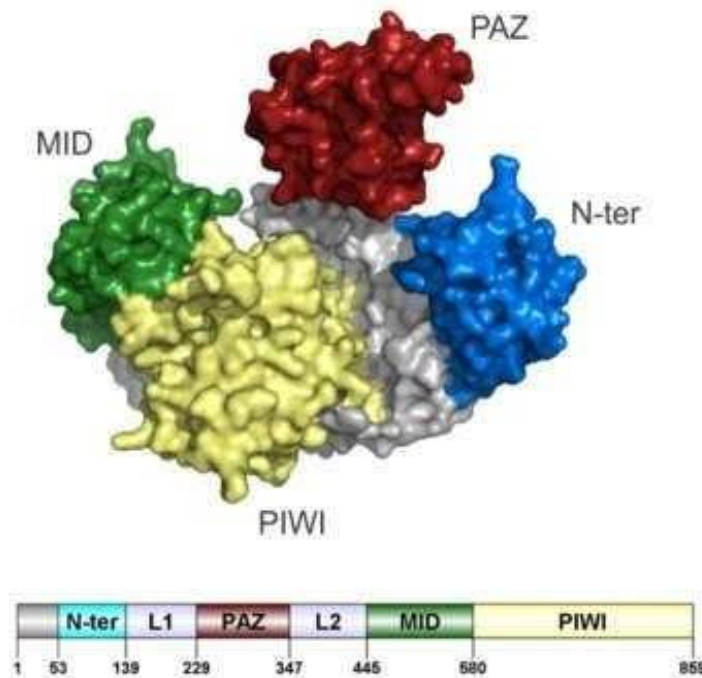


Figure 6 : structure des protéines Ago chez l'Homme. Les domaines N-ter, MID et PIWI forment une cavité partiellement remplie par le domaine PAZ ¹⁴.

Chez l'Homme, il existe quatre protéines Argonaute (Ago1, Ago2, Ago3 et Ago4) impliquées dans l'ARNi, mais seule Ago2 possède une activité ribonucléase RNase-like au sein du domaine PIWI. Cette activité, toujours médiée par deux atomes de magnésium reliés à trois résidus acides (Aspartate), confère au RISC la capacité de cliver l'ARNm cible d'un siARN ¹⁸.

2.1.2. Mécanisme d'action

Dans la voie des siARN, la complémentarité de séquence entre le siARN et son ARNm cible est parfaite. Suite à la reconnaissance et à la fixation du siARN sur sa cible, Ago2 clive l'ARNm entre le 10^{ème} et le 11^{ème} nucléotide par rapport à son extrémité 5' ¹⁸. L'ARNm clivé est ensuite dégradé par des endo et exonucléases cytoplasmiques non spécifiques. Le siARN est quant à lui protégé de cette dégradation par le RISC et peut être réutilisé pour fixer et inhiber d'autres ARNm cibles.

2.2. miARN

Les micro-ARN (*miARN*) 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* ¹⁹. 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 appartenant à la région 3'UTR de l'ARNm de *lin-14* (Figure 7). 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 du stade larvaire L1 au stade larvaire L2.

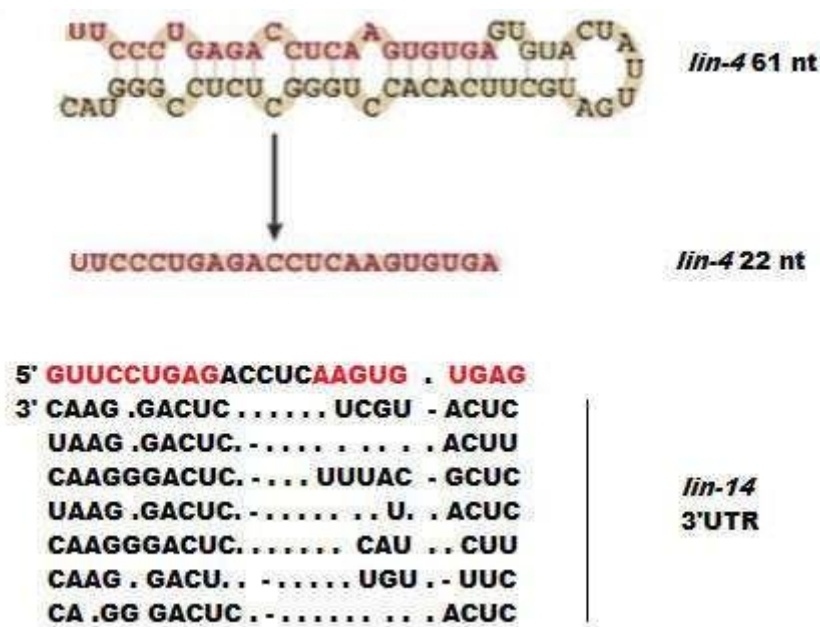


Figure 7 : ARN issus du gène *lin-4* et complémentarité avec l'ARNm de *lin-14* ¹⁹.

En 2000, Pasquinelli a démontré la conservation de ces petits ARN au cours de l'évolution via le constat de la présence d'un miARN, *let-7*, chez tous les eucaryotes testés ²⁰.

A ce jour, 2588 miARN 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) ¹².

Les miARN agissent en réseaux, c'est à dire qu'un miARN peut cibler en même temps une centaine d'ARNm différents et plusieurs miARN peuvent avoir la même cible. Cette redondance rend difficile la prédiction du rôle exact de chaque miARN.

<i>miARN</i>	<i>Rôle</i>
miR-124, miR-134	Développement des cellules neuronales
miR-1, miR-133a, miR-499	Développement des cellules cardiaques
miR-206, miR-208a/b	Développement des muscles squelettiques
miR-128, miR-181	Développement des cellules hématopoïétiques
miR-200, miR-302, miR-367	Développement embryonnaire

Tableau 1 : exemples de miARN impliqués dans la différenciation cellulaire.

2.2.1. Biosynthèse

La biosynthèse des miARN, autrement dit leur maturation, 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) ¹².

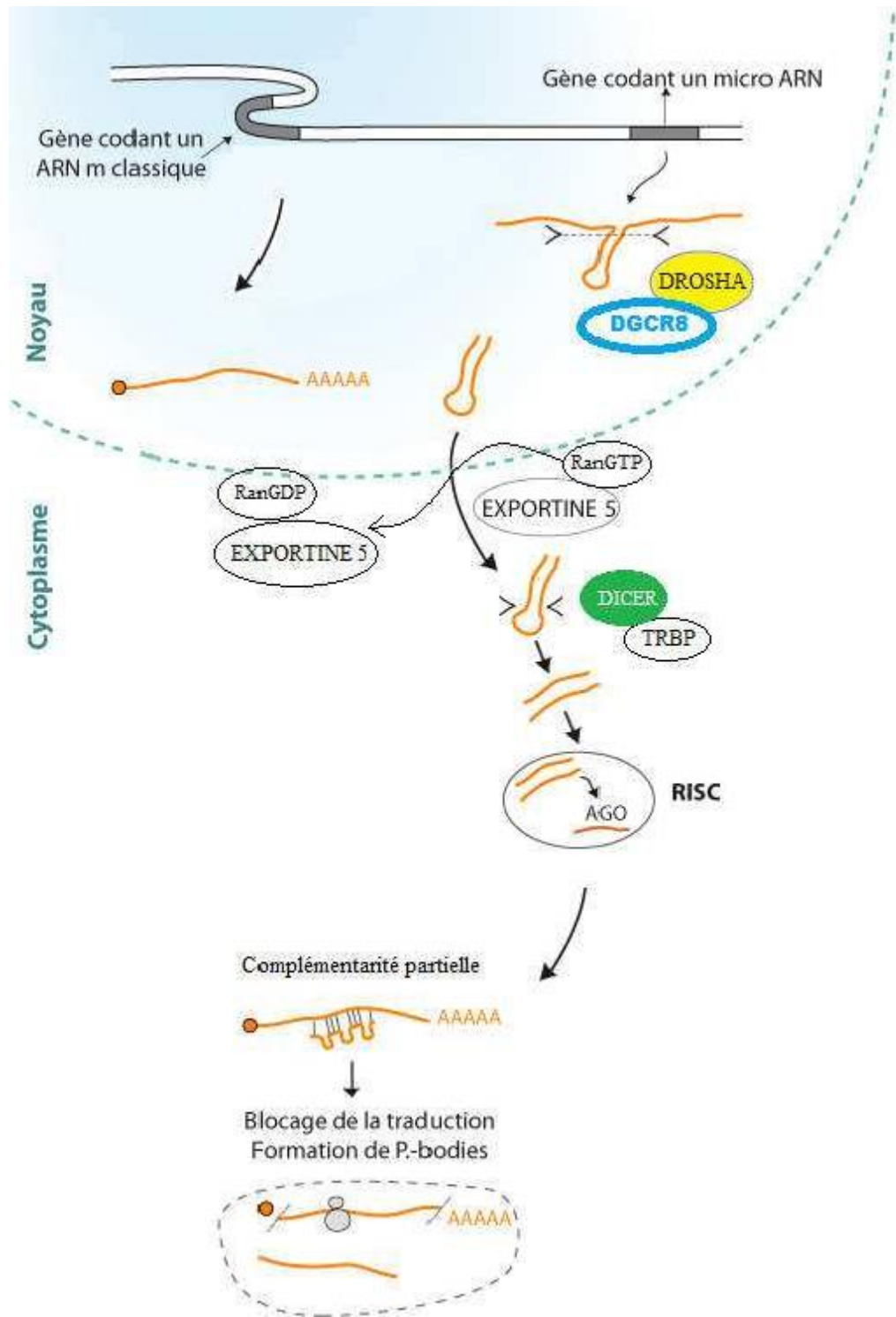


Figure 8 : voie d'extinction post-transcriptionnelle médiée par les miARN ¹².

2.2.1.1. Phase nucléaire

La voie « classique » de biosynthèse des miARN débute par la transcription d'un gène codant pour un miARN *via* une ARN polymérase II. Les miARN 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 miARN sont regroupés en cluster sous la forme de précurseurs polycistroniques possédant un même promoteur (Figure 9) ^{21,22}.

La transcription conduit à la formation d'un « micro-ARN primary » (*pri-miARN*) de taille supérieure à 1000 nucléotides. Ces *pri-miARN* 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' ¹².

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 (*DiGeorge Critical Region 8*) ¹⁵. Le clivage des motifs en épingles à cheveux par ce complexe trimérique conduit à la formation des « micro-ARN precursor » (*pre-miARN*) composés d'environ 70 à 80 nucléotides et ayant une structure tige-boucle.

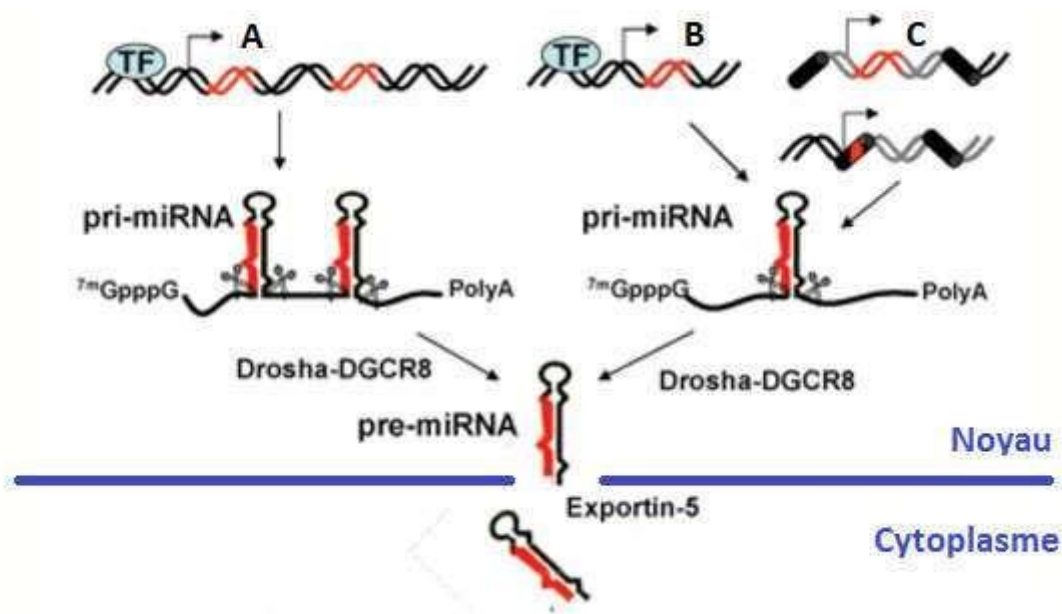


Figure 9 : phase nucléaire de la biosynthèse des miARN (A) transcription de précurseurs polycistroniques, (B) régions intergéniques, (C) transcription au niveau d'introns (en gris) ou d'exons (en noir). TF : facteur de transcription ²³.

Le microprocesseur DROSHA-DGCR8

La maturation des pri-miARN en pre-miARN au sein du noyau fait intervenir un complexe hétérotrimérique composé d'une endonucléase magnésium-dépendante, DROSHA (Figure 10), et de deux protéines de liaison à l'ARN, DGCR8.

DROSHA est une ribonucléase de type III composée de deux régions ¹⁴ :

- 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 (Figure 10) est une protéine de liaison à l'ARN double brin. Elle est transcrite à partir d'un gène présent sur un locus du chromosome 22. Elle se nomme

ainsi car la délétion de ce locus entraîne le syndrome de DiGeorge. Elle se compose de deux régions ¹⁴ :

- 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.

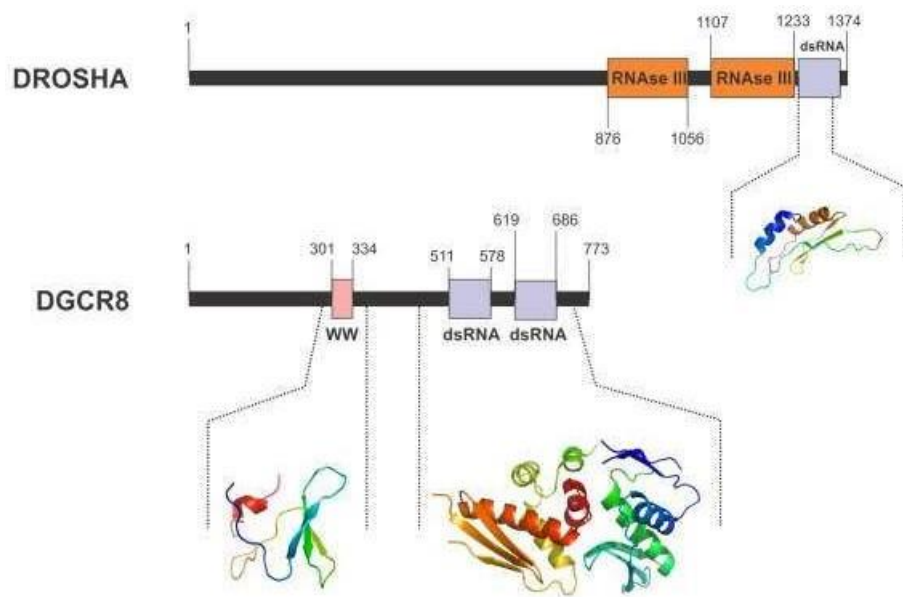


Figure 10 : structures de DROSHA et DGCR8 chez l'Homme ¹⁴.

DGCR8 reconnaît les motifs en épingles à cheveux des pri-miARN, 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) ¹⁵.

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^{ème} nucléotide en aval de la base de la tige pour libérer les motifs tige-boucle formant les pre-miARN. Le clivage par DROSHA via l'action des ribonucléases de type III entraîne l'apparition de deux nucléotides non appariés à l'extrémité 3' ¹².

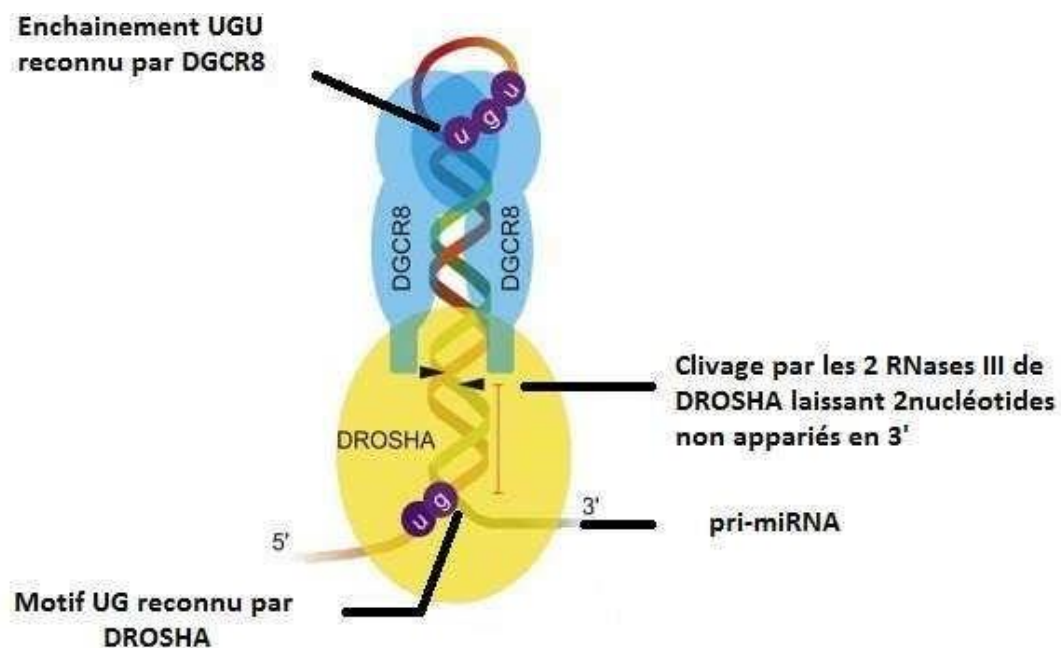


Figure 11 : fixation du microprocesseur nucléaire sur le pri-miARN ²⁴.

Les pre-miARN obtenus vont être exportés du noyau vers le cytoplasme *via* des pores nucléaires après association avec une protéine de liaison à l'ARN, l'Exportine 5. Cette protéine peut lier jusqu'à trois pre-miARN 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-miARN et les fixe dans une poche étroite par interactions ioniques spécifiques. Ce blocage des nucléotides terminaux assure une protection accrue des pre-miARN contre la dégradation par des ribonucléases, et ce durant leur transport. Une fois le complexe trimérique Exportine 5/Ran-GTP/pre-miARN acheminé dans le cytoplasme, le pre-miARN est libéré par hydrolyse du GTP en GDP ¹².

2.2.1.2. Phase cytoplasmique

La phase cytoplasmique de biosynthèse des miARN fait intervenir dans un premier temps le complexe Dicer-TRBP, de la même manière que dans la voie de biosynthèse des siARN. Le domaine PAZ de Dicer reconnaît les extrémités 3' et 5' des pre-miARN 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 miARN est conditionnée par la distance entre le domaine PAZ et les domaines ribonucléases IIIa et IIIb. Dicer agit donc comme une « règle moléculaire ».

Les miARN 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 ¹².

2.2.2. Mécanisme d'action

Lorsque le brin guide du miARN est chargé sur le miRISC, il peut cibler au choix plusieurs régions des ARNm régulés. Contrairement aux siARN, les miARN s'apparient de manière imparfaite avec l'ARNm cible. Néanmoins, la complémentarité entre la région située du 2^{ème} au 8^{ème} nucléotide sur le miARN (« *seed sequence* ») et la séquence correspondante de l'ARNm cible est primordiale pour obtenir une répression de la traduction et une dégradation de cet ARNm ¹².

Le mécanisme d'inhibition de la traduction pourrait passer par le recrutement d'une protéine de la famille GW182, nommée TNRC6C (Figure 12). Elle 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 miARN. Cette interaction TNRC6C-PABP-ARNm empêche la fixation du complexe d'initiation de la traduction eIF4G, inhibant ainsi la traduction de l'ARNm cible. Aussi, la protéine Argonaute du miRISC, liée à TNRC6C, s'associe au complexe déadénylase CCR4-NOT et à l'hélicase DEAD box DDX6 pour cliver la queue polyadénylée de l'ARNm ¹⁵. Enfin, cette même protéine Argonaute s'associe à DCP2 pour retirer la coiffe de l'ARNm qui est ensuite dégradé par l'exoribonucléase XRN1 ²⁵.

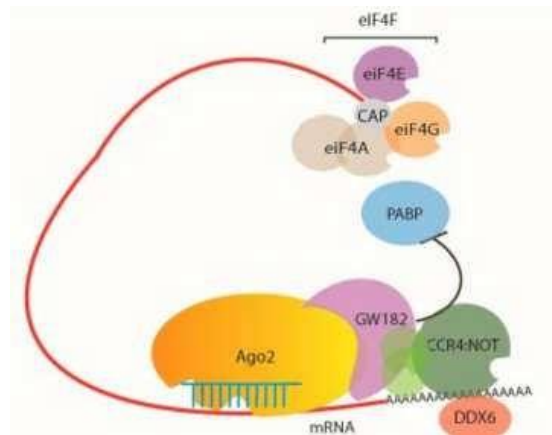


Figure 12 : voie d'inhibition de la traduction GW182-dépendante ¹⁵.

Une voie d'inhibition de la traduction indépendante de la protéine GW182 a récemment été suggérée. Elle pourrait passer par le blocage direct de la formation du complexe inducteur de la traduction eIF4F, par interaction entre le miRISC et la protéine eIF4A entraînant la sortie de celle-ci du complexe eIF4F (Figure 13) ¹⁵. Le blocage de l'initiation de la traduction pourrait aussi passer par l'inhibition du recrutement de la sous-unité ribosomique 60S ²⁶.

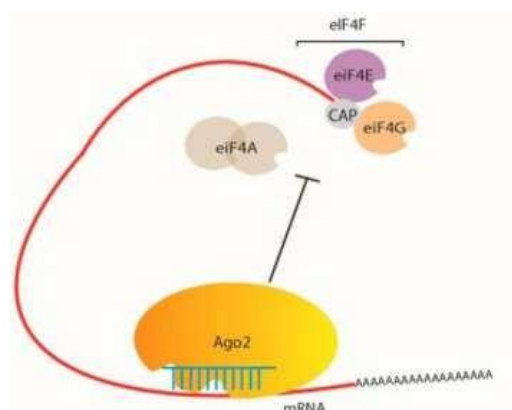


Figure 13 : voie d'inhibition de la traduction GW182-indépendante ¹⁵.

L'inhibition de la traduction de l'ARNm, ciblé par les miARN, pourrait également se produire par détachement des ribosomes pendant l'élongation ou par recrutement de protéases visant à dégrader les peptides naissants ²⁶.

2.3. *piARN*

Les « *piwi interacting ARN* » (*piARN*) sont des ARN simple brin de 24 à 32 nucléotides, qui assurent le mécanisme d'ARNi majoritairement dans les cellules germinales afin de diminuer l'expression des transposons, des éléments génomiques mobiles pouvant causer des mutations délétères ¹⁴.

Les précurseurs des piARN, les pre-piARN, 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 en piARN primaires (Figure 14) ²⁷.

Seuls les piARN présentant une Uridine en position 1 (1U-piARN) à leur extrémité 5' 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* ». Les 1U-piARN subissent ensuite une méthylation de leur extrémité 3' par la protéine HEN1 afin qu'ils soient protégés d'une dégradation rapide. Puis, ces piARN primaires s'apparient de manière partielle ou totale avec l'ARNm cible, entraînant le clivage de celui-ci. Sur l'ARNm, la position de ce clivage se trouve en face du 10^{ème} nucléotide situé en aval de l'extrémité 5'U du piARN complémentaire. Ce clivage donne naissance à un nouveau piARN, nommé piARN secondaire, constitué du fragment d'ARNm ainsi généré et caractérisé par une adénosine en position 10 (10A-piARN) complémentaire de l'Uridine portée en position 1 par le piARN primaire. Ce piARN secondaire subit à son tour une méthylation de son extrémité 3' par HEN1 lui assurant sa protection contre la dégradation. Il peut alors être reconnu par la protéine Argonaute3 pour ensuite aller cliver un pre-piARN, reformant ainsi à partir de celui-ci un autre 1U-piARN. Ce phénomène dit « ping pong » permet une amplification de l'extinction génique par les piARN. Il favorise une action rapide contre les transposons dans les cellules germinales à partir d'une faible quantité de piARN puisque ceux-ci peuvent être réutilisés pour fixer plusieurs ARNm cibles ²⁸.

Section II : Conséquences pratiques pour la conception d'un siARN

Une fois les mécanismes fondamentaux de l'ARNi acquis et la séquence génomique d'un gène d'intérêt connue, la première étape dans l'élaboration d'une thérapie utilisant l'ARNi est la conception de l'ARN interférent ciblant la séquence d'intérêt. On sait depuis 2001 qu'il était optimiste de penser qu'il suffirait d'utiliser un siARN contenant une séquence complémentaire du transcrit visé pour aboutir à une extinction ²⁹. En effet, pour une cible donnée, l'efficacité de différents siARN peut varier considérablement ^{1,30}. Dans cette section seront donc détaillés les paramètres pouvant influencer l'efficacité intrinsèque d'un siARN et qui conditionnent en pratique la conception d'un ARN interférent.

1. Influence des propriétés intrinsèques du siARN

1.1. *Influence de la séquence et des propriétés thermodynamiques*

La probabilité d'isoler un siARN très efficace a été considérablement augmentée après qu'il a été découvert que les deux brins d'un siARN ou d'un miARN ne sont pas incorporés au RISC de manière équivalente, d'où la notion de brin guide et de brin passager. De nombreuses études se sont attachées à montrer quels paramètres influençaient cette sélection mais les données relatives aux mécanismes chez les mammifères ne sont encore que partiellement élucidées et ce depuis très peu de temps ^{1,31}.

Pour identifier les paramètres intrinsèques des siARN qui influencent la sélection du brin antisens comme brin guide et améliorent l'efficacité du siARN, une équipe a réalisé une analyse systématique de 180 siARN ciblant deux gènes ^{1,32}. Huit

caractéristiques ont pu être relevées comme la richesse en G/C de l'extrémité 5' du brin passager, la richesse en A/U de l'extrémité 5' du brin guide ou des positions fréquentes de certains nucléotides au sein des brins guides et brins passagers.

Ces données ont été combinées dans un algorithme, lequel a permis la création de siARN dont l'efficacité se trouvait augmentée. En tout, six algorithmes dits de première génération ont été conçus la même année, prenant en compte la stabilité thermodynamique, les préférences positionnelles des bases, les structures secondaires des transcrits cibles et l'unicité de la séquence cible ^{1,33}.

Les algorithmes de première génération ne prenaient néanmoins pas en compte l'influence des paramètres les uns par rapport aux autres. Pour pallier cette lacune, une équipe a conçu l'année suivante un algorithme de deuxième génération qui prenait en considération les influences synergiques des paramètres identifiés comme favorisant la sélection du bon brin guide. Un programme a donc été construit avec les résultats obtenus sur plus de 2100 siARN dirigés contre 34 ARNm chez différentes espèces. L'algorithme *BIOPREDsi* a ensuite été éprouvé en prédisant l'efficacité de 250 siARN, avec un coefficient de corrélation de 0,66 entre l'efficacité prédite et l'efficacité mesurée. Il a enfin servi à constituer une banque de plus de 50 000 siARN prédits comme efficaces à partir du génome humain ^{1,34}.

En plus de *BIOPREDsi*, d'autres algorithmes de deuxième génération ont été conçus pour prédire l'efficacité des siARN en identifiant des préférences de bases azotées, comme le *ThermoComposition* de Shabalina et coll., le *DSIR* de Vert et coll. ou le *i-SCORE* d'Ichihara et coll. dont les coefficients de corrélation varient entre 0,63 et 0,69 ^{1,33}.

Ce dernier algorithme a permis de démontrer que la stabilité thermodynamique globale du siARN déterminée par son enthalpie libre était un facteur prédictif important et que négliger ce paramètre conduisait à des faux positifs, c'est-à-dire des siARN trop stables prédis à tort comme efficaces ^{1,33}. L'exclusion des siARN sélectionnés initialement par *i-SCORE* mais dont l'enthalpie libre était inférieure à -34,6 kcal/mol a permis d'affiner la sélection et de prédire l'efficacité de plus de 400 siARN avec un facteur de corrélation supérieur à 0,72.

Confronté au transcriptome humain, l'algorithme *i-SCORE* associé à la contrainte d'enthalpie libre minimale a prédit un nombre médian de 65 siARN efficaces par gène pour 95,9 % de transcrits potentiellement ciblables par au moins un siARN ^{1,33}.

Depuis 2007, de nombreux autres algorithmes ont été créés d'une part pour prédire l'efficacité intrinsèque des siARN et d'autre part pour l'optimisation des séquences visant à supprimer les extinctions collatérales ^{1,35}.

1.2. Influence de la séquence et de la conformation dans l'espace

Les algorithmes prédictifs ont néanmoins des limites. Des études ont ainsi mis en évidence des siARN très efficaces ne correspondant pas aux critères des algorithmes ou des siARN faiblement efficaces dont les séquences répondaient pourtant à ces critères ³⁶. Récemment, l'hypothèse de l'influence de la stabilité thermodynamique des extrémités des brins sur la sélection du brin guide a même été remise en question chez les mammifères ^{1,37}.

Au-delà de la succession linéaire des nucléotides, la séquence du siARN, par la conformation spatiale des brins qu'elle induit, pourraient jouer un rôle dans l'efficacité d'extinction. Une équipe s'est ainsi éloignée des siARN standards parfaitement appariés et a évalué de manière systématique différentes configurations de siARN déstructurés dont les brins antisens présentaient une structure en boucle et des extrémités en simple-brin ^{1,38}. Il a été montré que les siARN déstructurés induisaient l'effet d'extinction le plus fort.

Ces données sont cohérentes avec les capacités d'extinctions des miARN issus des pre-miARN, ces derniers présentant naturellement des décalages (« *mismatch* »), une structure en boucle avec des extrémités d'ARN simple-brin ¹.

1.3. Influence de la taille du siARN

Les siARN conventionnels correspondent à des ARN double-brin de 19 paires de bases avec deux nucléotides sortants à chaque extrémité 3'. Il a néanmoins été rapporté que des siARN plus longs pouvaient être plus efficaces. Dans une étude sur des siARN de taille variable, ceux de 27 paires de bases ont présenté un pouvoir d'extinction 100 fois supérieur aux siARN standards ³⁹. Dans une autre étude, des shARN (*short hairpin ARN*) de 29 paires de bases se sont montrés particulièrement

efficaces ^{1,40}. L'hypothèse était que les ARN double-brin un peu plus longs seraient mieux pris en charge par Dicer donc mieux chargés dans le RISC.

2. Limites imposées par le transcrit cible

En plus du siARN, l'ARN cible joue vraisemblablement un rôle important dans l'efficacité de l'extinction. Cela pourrait expliquer pourquoi celle de certains transcrits est très facile tandis qu'elle est difficile pour d'autres, même après optimisation. Dans une étude, plusieurs milliers de siARN dirigés contre différents gènes de kinase et optimisés à l'aide de l'algorithme *BIOPREDsi* ont été conçus ^{1,41}. Pour 70 % des gènes étudiés, l'extinction a été considérée comme facile avec 2 siARN efficaces pour 2 siARN testés. En revanche, pour 6 % des gènes, aucune extinction n'a été observée malgré l'utilisation de 10 siARN différents.

Des études avec des oligonucléotides antisens et des siARN ont montré que l'accessibilité et la conformation de la région de fixation étaient primordiales pour la dégradation du transcrit cible et qu'une région peu accessible était associée à une faible capacité d'extinction ⁴². Cette hypothèse a pu être confirmée en confrontant des siARN à des ARNm présentant des séquences d'accessibilité connue ^{1,43}. Pour prédire cette accessibilité, les auteurs ont combiné des prédictions obtenues par modélisation informatique avec des données obtenues *in vitro*.

Une étude systématique a démontré que le pouvoir d'extinction était dépendant dans un premier temps des propriétés thermodynamiques intrinsèques du siARN qui déterminent la sélection du brin guide, et dans un deuxième temps de l'accessibilité de la séquence cible ^{1,44}. Dans cette étude, les auteurs ont confronté des siARN à des ARN en épingle à cheveux dont les séquences cibles occupaient des positions variables. Un modèle en deux étapes expliquant les pertes d'efficacité des siARN a été conçu à partir de cette étude (Figure 15).

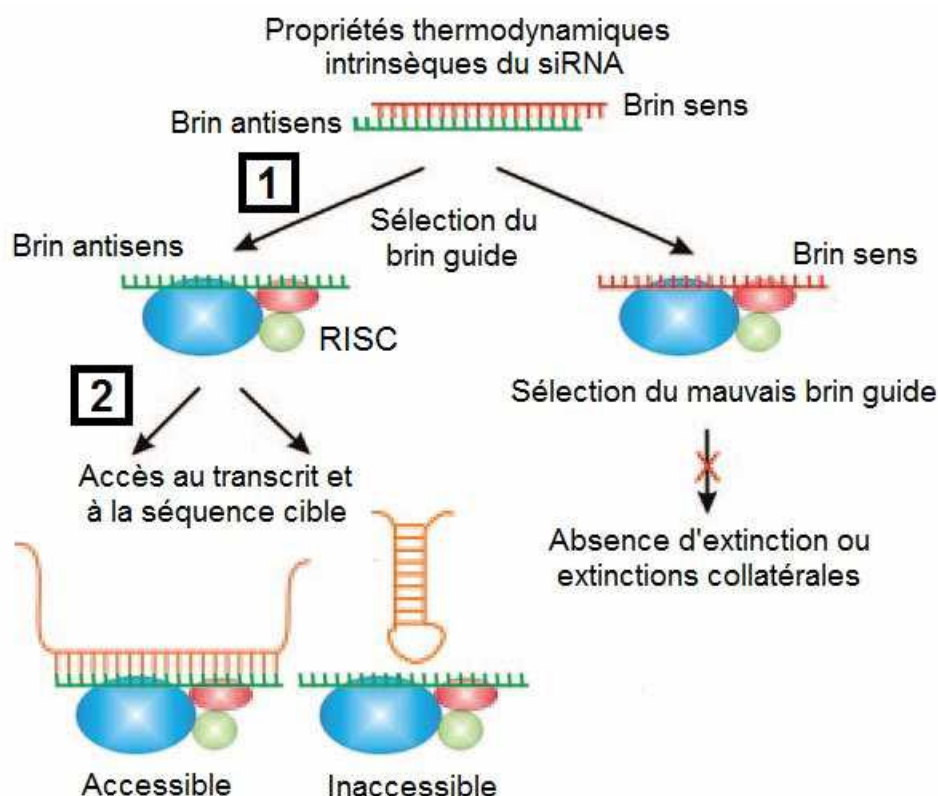


Figure 15 : modèle expliquant les pertes d'efficacité des siARN. Une première perte a lieu lors de la sélection du brin guide (1) et la seconde lors de l'accès à la cible car la facilité de cet accès est dépendante de la position de la séquence cible au sein du transcrit cible (2) ³⁶.

Le modèle de Schubert a pu être confirmé par une analyse d'environ 200 siARN et shARN dirigés contre les transcrits d'une centaine de gènes humains ^{1,45}. Il a été montré, par des analyses statistiques et thermodynamiques, que permettre l'accessibilité de la cible au siARN conduisait à une augmentation du pouvoir d'extinction de 40 % tandis que l'optimisation de la séquence n'améliorait l'extinction que de 26 %. En outre, l'estimation des propriétés thermodynamiques du transcrit cible serait pertinente : la mesure de l'enthalpie libre nécessaire à la linéarisation de la portion du transcrit contenant la séquence cible permettrait d'évaluer le niveau d'accessibilité de cette séquence.

Dans une autre étude, il a été montré que l'accessibilité de l'extrémité 3' de la séquence cible était particulièrement critique pour l'efficacité du siARN ^{1,46}. Ceci est cohérent avec le mécanisme d'extinction des siARN : la région *seed* dont dépend la reconnaissance de la séquence cible est située à l'extrémité 5' du brin guide donc,

par complémentarité, la région *seed* s'apparie avec l'extrémité 3' de la séquence cible d'où la nécessité pour l'extrémité 3' du transcrit cible d'être accessible.

De nouveaux algorithmes ont été trouvés pour aider à la conception des siARN, notamment ceux développés par le serveur Web *SFOLD*^{1,47}. Celui-ci prend en compte les caractéristiques thermodynamiques du siARN mais aussi celles du transcrit cible. Il convient de souligner qu'aucun des algorithmes et modèles présentés précédemment ne permet d'obtenir à coup sûr un siARN parfaitement opérationnel. Cela se vérifie d'autant plus lorsque le transcrit cible présente une conformation complexe et repliée peu adaptée à un accès et un clivage par les protéines du RISC. Enfin, d'autres facteurs prédictifs encore non identifiés interviennent probablement, comme des effets synergiques, et restent à découvrir³⁶.

Section III : Interférence ARN : un mécanisme aux multiples intérêts

Le projet génome humain, qui a établi le séquençage complet de l'ADN chez l'Homme dès 2003, a permis de déterminer que 20 000 à 25 000 gènes semblaient coder pour plus de 200 000 protéines⁴⁸. Mais la compréhension de leur rôle, de leur implication au niveau de la régulation ou dans certaines pathologies restent encore à élucider. À ce niveau, l'ARNi s'impose comme un outil très prometteur, notamment à travers l'utilisation de différents siARN, pour l'étude de centaines de gènes en parallèle. Ainsi, comme il le sera décrit dans cette partie, l'utilisation de l'inhibition post-transcriptionnelle a plusieurs intérêts interconnectés : comprendre la fonction des gènes, trouver de nouveaux biomarqueurs, isoler de nouvelles cibles thérapeutiques, et enfin développer de nouvelles thérapies basées sur ce mécanisme⁴⁹.

1. Un outil pour la compréhension de la fonction des gènes

Les informations connues sur le séquençage, corrélées à la présence de la machinerie ARNi dans toutes les cellules de l'organisme, ont ouvert la possibilité d'inhiber spécifiquement n'importe quel gène du génome humain ^{50,51}. Chez les cellules à division rapide, un effet maximal de l'inhibition par ARNi est atteint deux à trois jours après transfection et peut durer jusqu'à une semaine. Cette inhibition persiste jusqu'à plusieurs semaines chez les cellules possédant un faible taux de divisions ou une absence de division tels que les macrophages ou les neurones ^{31,52}.

1.1. *Un intérêt pour le diagnostic précoce : la recherche de biomarqueurs*

1.1.1. Définition

Un marqueur biologique, ou biomarqueur, est une caractéristique qui est mesurée et évaluée de manière objective comme un indicateur du fonctionnement normal d'un processus biologique ou physiologique, un indicateur d'un fonctionnement pathologique, ou encore un indicateur d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique ⁵³. Les biomarqueurs sont essentiels pour le diagnostic ou le suivi d'une pathologie. Leurs applications comprennent :

- Un rôle diagnostique pour l'identification des patients présentant une maladie ou des conditions pathologiques ;
- La détermination de l'ampleur d'une maladie afin de la classer en fonction de son avancée permettant ainsi de déterminer un pronostic ;
- Le suivi et la prédiction d'une réponse clinique suite à une intervention.

La recherche de biomarqueurs se fait généralement en plusieurs étapes (Figure 16) allant de sa découverte sur quelques échantillons à sa validation sur une population plus importante ⁴⁹.



Figure 16 : principe de la découverte de biomarqueurs : après la découverte d'un biomarqueur renforcée par une analyse différentielle, la validation à plus grande échelle est nécessaire avant une étude clinique sur une population élargie ⁴⁹.

En oncologie notamment, des biomarqueurs pronostics peuvent être représentés par la progression de l'expression de marqueurs biologiques. C'est le cas pour le suivi de l'expression des antigènes prostatiques spécifiques (PSA) dans l'évaluation du cancer de la prostate, ou encore des antigènes carcinoembryonnaires (CEA) dans le cancer colorectal ⁴⁹.

Les biomarqueurs peuvent également être des facteurs de risque. Ainsi, la leucémie myéloïde chronique et le cancer du sein peuvent respectivement être suspectés par la translocation du gène BCR-ABL et la surexpression du proto-oncogène HER2/neu ⁵⁴.

1.1.2. La recherche de marqueurs biologiques dans les faits

De nombreux marqueurs candidats permettent de comparer des phénotypes sains par rapport à des phénotypes d'état pathologique. Si un gène semble important pour le phénotype étudié, il paraît intéressant de suivre son expression pour une pathologie associée. En ce sens, l'inhibition fonctionnelle d'un gène ciblé par l'ARNi permet l'identification des modifications responsables d'un phénotype pathologique ^{55,56}. Un exemple intéressant de cette approche provient de l'étude sur la protéine EWS/FLI1, une cible oncogène présente spécifiquement chez la majorité des patients atteints de sarcome d'Ewing ⁵⁷. Une signature d'expression génique pour cette protéine a été identifiée pour un phénotype sain à l'aide de l'ARNi. Cette signature a été extraite et utilisée pour cribler des composés capables de modifier le profil de la signature d'une manière similaire. Cet examen a permis d'identifier des

modulateurs de cette protéine et la signature identifiée peut être utilisée pour la détermination rapide de son niveau d'activité ⁵⁸.

1.2. Un intérêt pour préparer une approche curative : la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques

1.2.1. Définition

L'ensemble des connaissances concernant les fonctions des gènes a pu être utilisé pour identifier les voies de signalisation et les mécanismes d'action impliqués dans des conditions pathologiques. Mieux encore, l'identification des acteurs impliqués dans ces mécanismes a permis de trouver un grand nombre de cibles potentielles pour de futures thérapies, notamment basées sur les siARN ⁵⁹.

Par exemple, dans le cas des pathologies cancéreuses, deux classes de gènes sont particulièrement suivies : les proto-oncogènes et les suppresseurs de tumeurs ⁶⁰. Un cancer est souvent le résultat d'une accumulation de mutations dans ces deux classes. Une expression exacerbée des proto-oncogènes provoquent la transformation de certaines cellules saines en cellules cancéreuses. Pour les suppresseurs de tumeur, ayant un rôle protecteur vis-à-vis de la cancérisation, des mutations de ceux-ci favorisent le développement de la maladie.

1.2.2. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les faits

Conceptuellement, la perte spécifique de la fonction d'un gène, ou d'une combinaison de gènes, dans les systèmes expérimentaux appropriés, devrait permettre de prévoir le résultat de l'utilisation de composés médicamenteux dans les cellules tumorales ^{61,62}. Diverses études *in vitro* utilisant ce procédé ont démontré l'intérêt de cette technique pour la validation de cibles potentielles dans le traitement de maladies ⁵⁶. Dans ce cadre, les travaux de Zuber *et al.* ont notamment permis l'identification de la protéine Brd4 comme cible thérapeutique de la leucémie myéloïde aiguë ⁶³.

Les biomarqueurs identifiés peuvent également avoir un potentiel de ciblage thérapeutique. Par exemple, une protéine surexprimée, témoignant d'un phénotype

altéré, peut devenir la cible privilégiée d'une action thérapeutique afin de rétablir l'état physiologique recherché ⁴⁹.

2. Un outil pour de nombreuses applications en thérapeutique

Comme vu précédemment, il existe à l'heure actuelle un intérêt grandissant des chercheurs à utiliser l'ARNi dans un but thérapeutique ⁶⁴, par exemple en cancérologie, pour inhiber l'expression d'un oncogène, ou encore en virologie, pour inhiber la multiplication virale. La spécificité du mécanisme d'ARNi permettrait de développer des traitements avec moins d'effets secondaires. De plus, ces traitements présentent une facilité de synthèse et de faibles coûts de production en comparaison des outils thérapeutiques à base de protéines ou d'anticorps ^{2,65}.

2.1. Maladies virales

Puisque l'ARNi semble être un ancien mécanisme de défense antivirale chez les mammifères, l'inhibition de la réplication des virus a été considérée comme un bon point de départ pour l'évaluation du potentiel thérapeutique de cette stratégie ².

L'inhibition de la réplication virale par ARNi a ainsi été démontrée *in vitro* pour une large variété de virus, incluant des virus à ARN tels que le VIH, le rotavirus, le virus respiratoire syncytial, le virus de la grippe ou de la poliomyélite, mais aussi des virus à ADN comme le papillomavirus ou le virus de l'herpès ⁶⁶. Le mécanisme d'ARNi s'est également révélé efficace avec les virus des hépatites B et C ^{2,67}.

Bien que la plupart de ces études aient été réalisées *in vitro*, des résultats prometteurs dans l'inhibition de la multiplication virale ont été obtenus chez la souris, notamment avec le virus de l'hépatite B ⁶⁸, l'influenza virus ⁶⁹ ou d'autres virus respiratoires ^{2,70}.

2.2. VIH

Parmi les maladies virales, il en est une particulière qui représente un grand défi pour les chercheurs, l'infection par le VIH. Si de nombreuses molécules antivirales ont déjà été développées, il est couramment observé une augmentation de la résistance des souches aux médicaments prescrits ^{2,71}, c'est pourquoi il est nécessaire de persévérer dans la recherche de nouveaux traitements. Le phénomène d'ARNi, depuis sa découverte, y apporte beaucoup d'espoir.

Tout d'abord, les siARN peuvent interférer à différentes étapes du cycle intracellulaire de réplication du virus ^{2,72}. Mais cette stratégie présente aussi ses limites, compte tenu du comportement du virus. En effet, il suffit d'une différence d'une paire de bases entre la séquence cible et le siARN pour diminuer drastiquement l'effet d'interférence, or la transcriptase inverse présente un taux d'erreur élevé, estimé à 1/1000 par cycle de réplication. D'autre part, il existe entre les personnes infectées une très grande diversité de séquences ; la conception de siARN efficaces s'avère donc compliquée.

Une approche plus réaliste semble être de cibler les récepteurs ou corécepteurs dont le virus se sert pour l'infection des cellules ^{2,72}.

2.3. Cancers

Les cellules cancéreuses expriment des protéines qui diffèrent qualitativement et quantitativement de celles retrouvées habituellement chez les cellules non cancéreuses, et dans certains cas, la cellule tumorale peut même exprimer une protéine qui n'existe pas à l'état naturel. On voit donc l'intérêt de l'inhibition spécifique de protéines cibles en thérapie anti-cancéreuse. D'autre part, l'absence de certains miARN spécifiques au sein des cellules carcinomateuses a été démontrée, impliquant que le développement cancéreux pourrait être arrêté par l'introduction de ces miARN manquants ^{2,73}.

La croissance et la survie des cellules tumorales ont été stoppées grâce à l'utilisation de l'ARNi qui a permis de cibler plusieurs oncogènes clés ou gènes promoteurs de tumeurs (facteurs angiogéniques et de croissance), ou bien leur récepteur (facteur de croissance endothélial vasculaire, récepteur du facteur de

croissance épidermique) ⁷⁴. Ce potentiel d'inhibition de la croissance tumorale a également été démontré *in vivo* ^{2,75}.

2.4. Autres maladies

La possibilité de cibler, *via* l'ARNi, une grande variété de séquences spécifiques géniques constitue une stratégie très prometteuse afin d'inhiber l'expression de certains gènes, responsables du développement de maladies neurodégénératives pour lesquelles on ne dispose pas encore de traitements efficaces. Parmi ces maladies, on retrouve la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington ou encore l'ataxie spinocérébelleuse ^{2,76}.

Une autre application de l'extinction par ARNi est le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (*DMLA*). En effet, l'œil dispose d'un des tissus les plus accessibles pour l'administration locale de siARN. La cible visée traitant cette maladie est cliniquement validée depuis longtemps, il s'agit du facteur de croissance endothélial vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor* ; *VEGF*) ^{2,77}.

3. Conclusion

L'ARNi est un outil aux possibilités innombrables. D'abord utilisée pour comprendre la simple fonction des gènes en étudiant l'impact d'une inhibition spécifique au niveau d'un phénotype, son application s'est rapidement déclinée vers un dessein thérapeutique. Ainsi, son rôle peut intervenir à différents niveaux :

- Dans l'établissement de diagnostics par la recherche de biomarqueurs témoignant d'un état pathologique. L'application peut être utilisée en prédiction d'une possible atteinte avant l'expression clinique de la maladie ;
- Dans la recherche de nouvelles cibles sur lesquelles s'orienter afin d'obtenir un traitement efficace ;
- Dans une action thérapeutique ciblée et hautement spécifique contre ces mêmes cibles, en utilisant les ARN interférents comme agents thérapeutiques ⁴⁹.

Ainsi, depuis sa découverte en 1998, l'ARNi a progressivement été identifiée comme une voie majeure dans la recherche et offre des perspectives pharmaceutiques très prometteuses. Cependant, la transfection de séquences courtes d'acides nucléiques jusqu'au compartiment cytoplasmique peut être limitée. En effet, au cours de leur délivrance, les ARN interférents sont confrontés à différents obstacles les empêchant de rejoindre la machinerie ARNi ⁴⁹.

Section IV : Induction de l'ARNi, contraintes associées à la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques

Pour induire le mécanisme d'ARNi avec des ARN interférents synthétiques exogènes, de nombreuses contraintes nécessitent d'être surmontées à différents niveaux : en matière de stabilité des acides nucléiques, dans le ciblage des cellules désirées et dans l'accessibilité au compartiment cytoplasmique, que ces acides nucléiques soient encapsulés dans des nanoparticules (*NP*) ou non ⁴⁹. Au sein de cette section, ces limites seront mises en exergue. La Figure 17 ci-dessous donne un aperçu des différentes barrières que doit franchir un ARN interférent (encapsulé ici dans une *NP*) avant de pouvoir atteindre sa cible, et ce depuis son point d'injection.

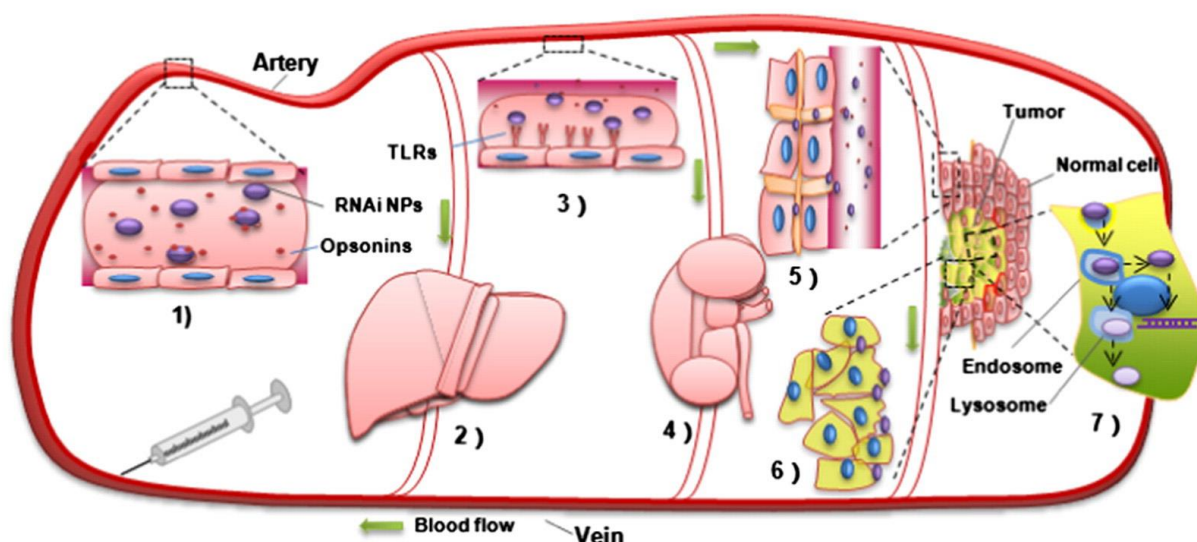


Figure 17 : représentation des différentes barrières fréquemment rencontrées pour un ARN interférent (dans le cas présent encapsulé dans une NP) depuis son point d'administration en intraveineuse jusqu'à son éventuel échappement endosomal : 1) opsonisation par les protéines sériques ; 2) filtration par le système réticulo-endothélial ; 3) immunostimulation (TLR: Toll-like receptor) ; 4) clairance rénale ; 5) matrice extracellulaire ; 6) absorption cellulaire ; 7) échappement de l'endosome ; etc ⁷⁸.

1. La stabilité des ARN interférents

Les ARN possèdent une faible stabilité aux pH physiologiques, limitant leur utilisation comme principe actif. Ainsi, ces molécules restent très sensibles aux nucléases, en particulier les RNases, et nécessitent une attention particulière lors de leur utilisation. Ceci est d'autant plus vrai dans les milieux extracellulaires, en particulier dans le sang, avec une présence importante de nucléases non spécifiques. Malgré une conformation en duplex plus résistante que celle en simples brins, la demi-vie d'une molécule de siARN reste très faible et n'atteint que cinq minutes dans le plasma ⁷⁹.

Néanmoins, certains travaux démontrent une utilisation possible des siARN sous forme simple, notamment pour des tissus superficiels tels que l'œil, la peau et les muqueuses ⁸⁰. D'ailleurs, le fomivirsén (Vitravene®), un oligonucléotide antisens, a

déjà été utilisé en clinique dans le traitement du cytomégalo­virus ⁸¹. Un autre exemple pertinent voit l'utilisation des siARN en administration locale pour soigner certaines maladies pulmonaires. De cette manière, un contact direct avec les épithéliums pulmonaires est permis en distillant les siARN par voie nasale ou endotrachéale ⁸². L'administration locale de siARN a l'avantage d'offrir une biodisponibilité élevée et une réduction des effets secondaires systémiques par rapport à la voie générale. Cependant, elle n'est envisageable que pour des organes facilement accessibles. L'administration systémique reste la seule voie possible pour atteindre les organes inaccessibles par voie locale. Pour que les siARN puissent atteindre les cellules cibles en quantité suffisante, il est nécessaire de développer une stratégie permettant d'augmenter leur temps de demi-vie. Cette augmentation de la demi-vie est notamment possible en les protégeant des nucléases ⁴⁹.

La plupart des transfections d'ARN interférents nécessitent un temps d'incubation important de ces petits acides nucléiques au sein des milieux biologiques ou de culture. Dès lors, la fragilité de ces molécules nécessite un système de protection efficace afin qu'elles puissent résister suffisamment longtemps dans ces milieux avant d'atteindre les cellules cibles, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* ⁴⁹.

2. La biodistribution

2.1. Une distribution non-spécifique

En plus d'une faible stabilité, les ARN interférents exogènes doivent surmonter d'autres difficultés pour atteindre leur cible et exercer une action biologique, principalement *in vivo*. En effet, la distribution des molécules au sein de l'organisme repose essentiellement sur la perméabilité tissulaire, elle-même étroitement liée à la perméabilité vasculaire locale. Celle-ci varie selon les tissus : certains sont au contact d'un environnement vasculaire ne laissant passer que des petites molécules et de l'eau, alors que d'autres présentent des vaisseaux moins sélectifs ⁴⁹. Ainsi, l'endothélium vasculaire retrouvé à proximité d'organes tels que le cerveau, le cœur, les muscles et les poumons, est plutôt hermétique au passage des ARN interférents. *A contrario*, l'endothélium au contact des cellules du tube digestif, des cellules

rénales, mais surtout des cellules du foie, est favorable au passage d'acides nucléiques « nus » ou de formulations innovantes à base d'acides nucléiques ⁸³.

Certains organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie (foie, rate, reins) procurent une difficulté supplémentaire. De par leur faible taille (environ 13 kDa), les siARN sont excrétés dans les urines en quelques minutes ⁸⁴. En effet, ces molécules possèdent une taille inférieure à la limite de filtration glomérulaire et sont donc soumises à une excrétion rapide au niveau rénal. De plus, les phagocytes du système réticulo-endothélial, ceux au niveau du foie et de la rate, peuvent « séquestrer » les oligonucléotides après les avoir assimilés.

Une autre limite de la biodistribution est celle de l'absence de système d'adressage. En effet, une distribution aspécifique des siARN, après administration systémique, peut provoquer une dilution de ceux-ci au niveau de différents tissus. Par conséquent, la concentration locale en siARN devient trop faible pour induire un effet biologique au niveau des tissus et/ou cellules ciblés en priorité ⁸⁴.

Ainsi, la distribution des ARN interférents nécessite l'utilisation d'un système d'adressage afin de cibler de manière spécifique les cellules et/ou tissus désirés. Par ce moyen, les concentrations en acides nucléiques atteignant les cellules ciblées seraient optimales pour induire un niveau d'ARNi efficace. De plus, réduire la distribution non-spécifique des ARN interférents autorise une diminution des effets d'inhibition non-voulus dans les autres cellules ⁴⁹.

2.2. L'internalisation

Une fois la cellule atteinte, l'accessibilité aux compartiments intracellulaires, et plus particulièrement au compartiment cytoplasmique, se présente comme une nouvelle difficulté à surmonter. Les siARN ayant un caractère polyanionique de par leur structure comportant des groupements phosphates PO_4^- (Figure 18), la membrane plasmique leur est difficilement franchissable en raison de son potentiel électrochimique aussi négatif ⁸⁵.

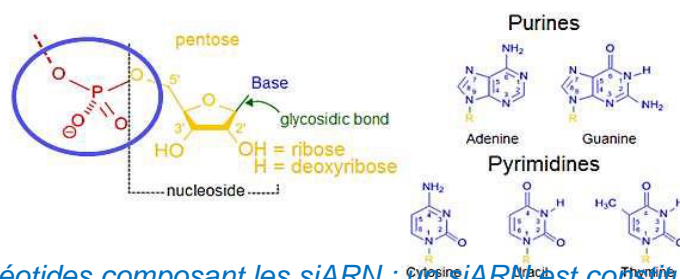


Figure 18 : les nucléotides composant les siARN : un siARN est constitué de 19 à 23 paires de nucléosides monophosphate ⁴⁹.

La diffusion des siARN au travers des membranes plasmiques est très limitée. Néanmoins, la littérature rapporte une dichotomie entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* dans la délivrance des ARN interférents ⁸⁶ : alors que l'utilisation de siARN *in vitro* ne produit que rarement des effets sans l'utilisation d'un outil de transfection adapté, des expériences similaires dans des conditions *in vivo* montrent une induction de l'inhibition par ARNi sans dispositif de transfection ⁸⁶. Par exemple, des essais cliniques utilisant des ARN interférents « nus » ont présentés des résultats probants chez vingt patients atteints de la maladie de Crohn ⁸⁷. Robertson rapporte que la dépendance aux stéroïdes a été réduite de manière significative chez 75 % des patients après administration par voie systémique de l'oligonucléotide testé ; une rémission de la maladie a été permise pendant plusieurs mois chez dix de ces patients ⁸⁷. L'une des hypothèses les plus probables expliquant cette dichotomie *in vitro* / *in vivo* propose une approche pharmacodynamique : en raison des contraintes expérimentales, les cellules en culture sont trop brièvement exposées aux oligonucléotides ; en revanche, la plupart des expériences *in vivo* impliquent de tester successivement plusieurs doses pour des expositions prolongées, permettant une accumulation intracellulaire progressive des oligonucléotides ⁸⁶.

Néanmoins, l'utilisation d'un outil de transfection reste nécessaire pour optimiser cette étape d'internalisation *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Les conditions expérimentales *in vivo* semblent moins affectées par cette étape, mais restent soumises aux autres limites exposées dans cette partie, notamment la dégradation rapide des ARN interférents ⁴⁹.

2.3. L'accessibilité du compartiment cytoplasmique

Pour pallier aux obstacles mentionnés précédemment, de nombreuses techniques ont été développées (cf deuxième partie). La majorité d'entre elles impliquent une internalisation des ARN interférents *via* les différents mécanismes d'endocytose, parmi lesquels coexistent la macropinocytose, la voie des cavéosomes, ou encore celle des endosomes. Cette dernière, qui est la plus utilisée par les acides nucléiques, va maintenant être développée.

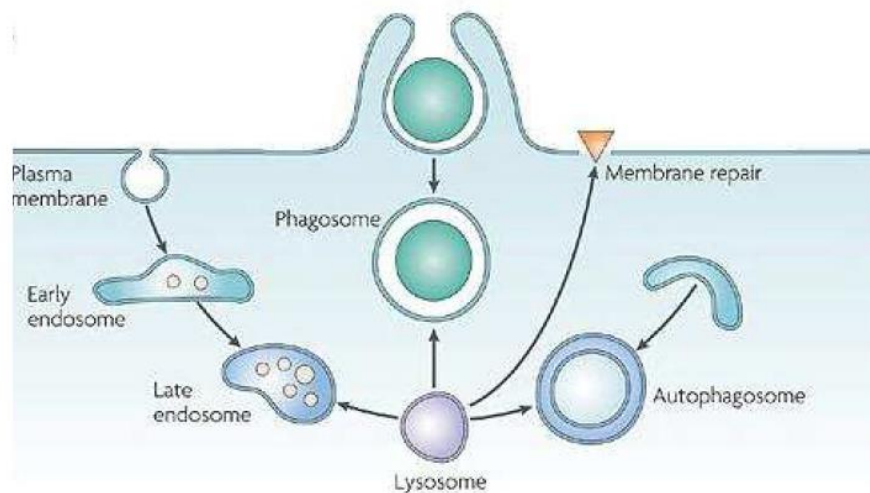


Figure 19 : de l'internalisation par endocytose à la dégradation lysosomale ⁸⁸.

Pour rappel, le processus d'endocytose, par l'invagination de la membrane plasmique, forme des vésicules endosomales (Figure 19). Ces vésicules fusionnent entre elles pour former un compartiment de forme irrégulière appelé endosome précoce. L'endosome précoce se différencie par la suite en endosome tardif, entraînant une diminution du pH intra-vésiculaire de 7,4 à 6,5. L'endosome tardif, caractérisé par de nombreuses invaginations et vésicules internes, est en partie responsable de la dégradation des protéines par hydrolyse. Dans l'étape suivante, l'endosome tardif fusionne avec des vésicules d'hydrolyse, provenant de l'appareil de Golgi, ou avec un lysosome primaire pour former un lysosome mature ^{89,90}. Les lysosomes sont les organites cellulaires associés à la digestion intracellulaire. Ils sont caractérisés par un pH acide (entre 4,5 et 5,5) et la présence d'hydrolase en grande quantité permettant la dégradation de toutes les classes de molécules (Figure 19) ⁸⁸.

Dès lors, il devient nécessaire de développer des stratégies permettant aux ARN interférents de sortir rapidement de ces structures lors de leur internalisation ⁸². L'état de l'art décrit deux moyens solutionnant ce problème d'internalisation, tous deux dépendants des caractéristiques des molécules associées aux séquences d'ARN interférents transportées : l'échappement endosomal par « appariement ionique » et l'échappement par « effet pompe à protons ».

2.3.1.Échappement endosomal par « appariement ionique »

Cette stratégie a été proposée pour la première fois avec l'utilisation de liposomes cationiques qui, associés à des plasmides d'ADN, forment des lipoplexes ⁹¹. Après endocytose, les lipides cationiques forment des paires d'ions avec les phospholipides anioniques composant la membrane des endosomes qui s'en trouve déstabilisée (Figure 20A). En effet, les interactions électrostatiques induisent la formation de micelles inversées, dites H_{II}, au cœur de la bicouche lipidique de l'endosome, provoquant une forte instabilité de celle-ci ⁹². L'appariement ionique exige un contact direct entre la molécule cationique et la membrane anionique. L'utilisation de cette stratégie nécessite donc une adaptation de la configuration de la molécule de transport, ceci afin d'éviter un encombrement stérique à sa surface nuisant à l'établissement des interactions électrostatiques.

Dans cette optique, Akita *et al.* ont formulé des vecteurs comprenant des molécules de polyarginine et un lipide fusogène neutre, le DOPE (ou *1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine*), facilitant l'échappement endosomal par appariement ionique ⁹³. En outre, cette équipe a pris le parti d'ajouter un peptide dont la conformation dépend du pH dans la formulation, GALA (une répétition des motifs « acide glutamique – alanine – leucine – alanine »). En effet, GALA est un peptide soluble dans l'eau avec une conformation apériodique à pH neutre, mais devenant une hélice alpha amphiphile qui interagit avec les bicouches lipidiques de l'endosome à des pH inférieurs à 5, favorisant ainsi l'échappement endosomal ⁹³.

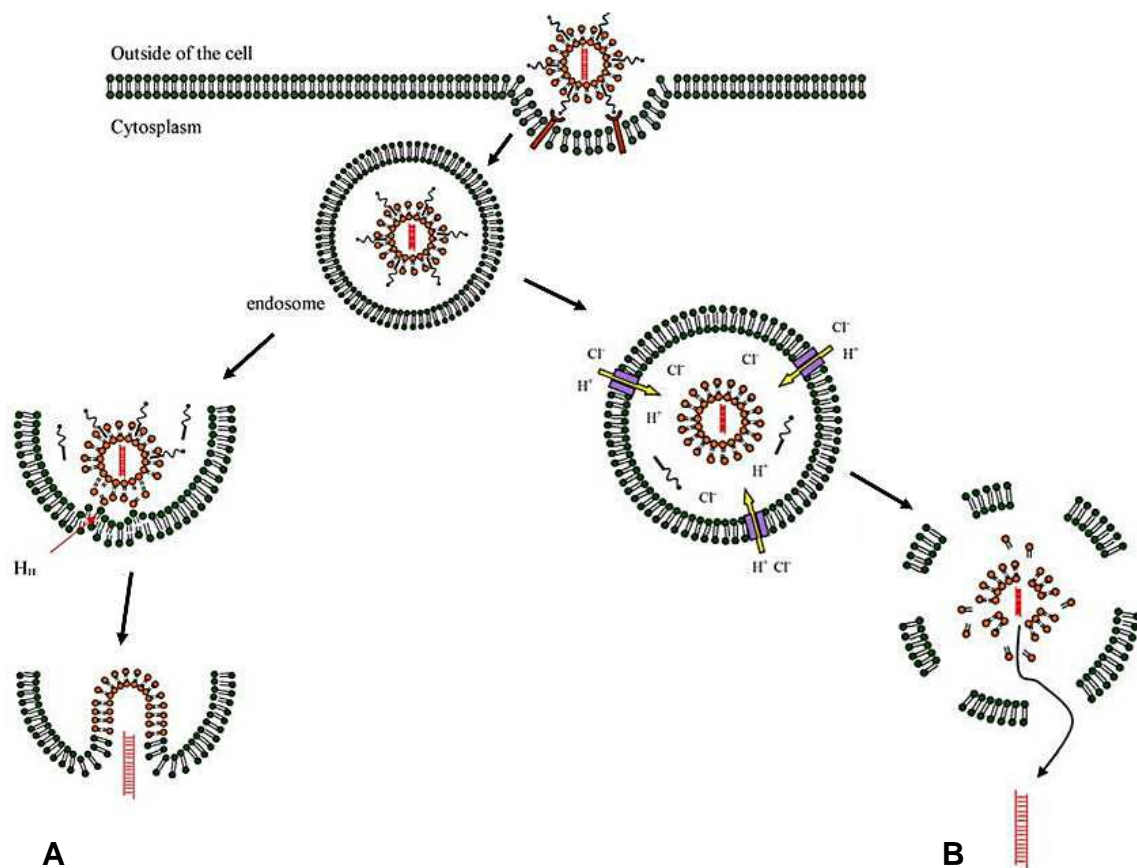


Figure 20 : les mécanismes d'échappement endosomal ; il existe deux mécanismes d'échappement de la vésicule d'endosome : par « appariement ionique » (A) ou par « effet pompe à proton » (B) ⁹⁴.

2.3.2.Échappement endosomal par « effet pompe à protons »

Le second mécanisme permettant l'échappement endosomal utilise « l'effet pompe à protons ». Cette stratégie nécessite l'utilisation d'une molécule possédant un pouvoir tampon : la présence de groupements amines (primaires, secondaires et tertiaires), caractérisés par des pKa différents, favorise la pénétration endosomale, par compensation, d'ions à charge positive provoquant une diminution du pH, nécessaire à la maturation des endosomes. Ainsi, il s'établit un échange ionique entre la vésicule et le cytoplasme, caractérisé par une entrée de protons et d'ions chlorure Cl⁻ dans l'endosome (Figure 20B). Par effet osmotique, l'eau pénètre également dans la vésicule qui gonfle jusqu'à éclatement ⁹⁵, libérant ainsi son contenu dans le compartiment cytoplasmique.

De nombreuses études se sont appuyées sur l'utilisation de vecteurs polymériques contenant de la polyéthylène-imine (PEI) afin de favoriser ce type de mécanisme d'échappement endosomal. Ainsi, une étude a décrit une efficacité d'inhibition de l'expression du gène VEGF supérieure à 80 % lors de la transfection de siARN dans des cellules HepG2 à l'aide d'un vecteur PEI ⁹⁶, prouvant l'action endosomolytique d'un tel vecteur.

2.4. Les effets secondaires potentiellement néfastes liés à l'utilisation des ARN interférents

L'utilisation des ARN interférents est confrontée à d'autres limites dues à la nature même de leurs séquences et/ou au détournement du mécanisme endogène d'ARNi par des molécules exogènes ⁴⁹.

2.4.1. L'induction possible de réponses immunitaires

Des études ont rapporté que les ARN doubles brins, dont les siARN, pouvaient provoquer une réponse immunitaire innée. En effet, dans le cytoplasme et les endosomes, des kinases ARN-dépendantes, nommées PKR, induisent l'activation de la voie de signalisation des interférons ⁹⁷. Cette action provoque la production de cytokines pro-inflammatoires par activation du facteur de transcription NFκB. Cependant, les facteurs d'induction des réponses immunitaires sont directement dépendants de la taille des siARN utilisés : malgré une réaction immunitaire possible avec de courtes séquences d'ARN interférents, la puissance de l'activation de la voie de signalisation des interférons est corrélée avec l'augmentation de la taille des séquences ARN utilisées ⁹⁸. En outre, la présence de nucléotides appariés à l'extrémité 3' des siARN est décrite comme un facteur supplémentaire pouvant induire cette réponse immunitaire ⁹⁹.

En complément de l'induction par les kinases PKR, des réponses immunitaires peuvent également être déclenchées lors de la reconnaissance d'ARN exogènes par des récepteurs de type Toll-like (TLR). Ces récepteurs sont directement impliqués dans la reconnaissance de matériel génétique étranger comme celui des pathogènes. Plus particulièrement, les TLR 3, 7 et 8 sont reconnus pour avoir une

affinité importante avec les ARN. Leur activation au niveau de l'endosome conduit à une cascade de réactions intracellulaires à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les TLR présentent une affinité plus importante pour les séquences d'ARN riches en motif « GU » et « AU » ¹⁰⁰ et entraînent des réponses plus fortes lors de la reconnaissance d'ARN simples brins. De plus, comme pour les PKR, les ARN possédant des séquences longues induisent plus facilement une réponse immunitaire ¹⁰⁰.

Ainsi, pour limiter le risque de réponse immunitaire, les séquences des siARN doivent être optimisées en privilégiant les petites tailles et en évitant les motifs « GU » et « AU ». D'autres stratégies sont possibles afin de limiter la production de cytokines par les cellules transfectées. Par exemple, Judge *et al.* ont totalement supprimé l'induction de réponses immunitaires en corrigeant sélectivement jusqu'à 20 % des séquences produites grâce à l'incorporation de nucléosides modifiés ¹⁰¹. En outre, une autre stratégie possible est de diminuer les concentrations utilisées en ARN interférents ce qui permet de réduire les effets induits par la transfection.

2.4.2. Les effets aspécifiques

Les effets non-spécifiques (« *off-target* ») sont des inhibitions d'ARNm différents des ARNm ciblés. Ils présentent les inconvénients :

- d'entraîner des conséquences potentiellement néfastes pour la cellule. L'inhibition non contrôlée de gènes non-ciblés pourrait provoquer le déclenchement des mécanismes d'apoptose ou l'inhibition de la croissance cellulaire ¹⁰² ;
- de produire des faux positifs conduisant à des difficultés d'interprétation. En effet, l'induction d'une inhibition aspécifique peut interférer sur le phénotype autant que l'effet spécifique voulu ¹⁰³.

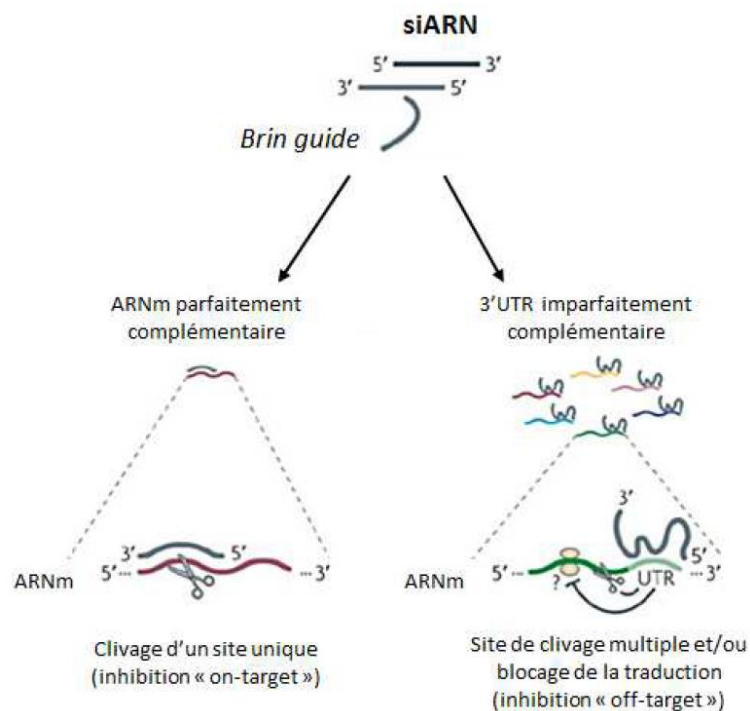


Figure 21 : effets spécifiques et aspécifiques des siARN ¹⁰⁴.

Ce type d'effet indésirable a été observé pour la première fois en 2003. À cette occasion, Jackson *et al.* ont déterminé que les effets aspécifiques ne sont pas dus au hasard et que chaque siARN possède un profil d'extinction spécifique ¹⁰⁵. Pour rappel, la complémentarité parfaite du brin antisens du siARN avec un ARNm cible produit l'inhibition spécifique désirée grâce au clivage de cet ARNm (« *on-target* ») (Figure 21). En revanche, en plus de cet effet désiré, certains siARN provoquent l'inhibition d'ARNm non-ciblés *via* un fonctionnement similaire à celui des miARN. En raison notamment de la reconnaissance de la région *seed* du siARN par une séquence complémentaire de la région 3'UTR des ARNm, l'appariement imparfait du brin antisens du siARN avec cette région des ARNm peut entraîner des inhibitions non-ciblées (« *off-target* ») avec blocage de l'étape de traduction (Figure 21) ¹⁰⁵. Ainsi, chaque ARNm devient une cible collatérale potentielle soumise au mécanisme d'ARNi. L'ARNi avec blocage de la traduction permet une inhibition post-transcriptionnelle d'intensité plus faible que celle occasionnée par le clivage de l'ARNm ¹⁰⁶.

Pour pallier à ce problème de spécificité, une attention particulière doit être portée lors de la conception du siARN. Leur synthèse doit permettre d'éviter la

complémentarité de la région *seed* avec une séquence présente dans les portions 3'UTR du transcriptome ³⁶. Une autre solution permettant de limiter les risques d'inhibition non-spécifique consiste à réduire les concentrations utilisées en siARN, diminuant ainsi le nombre de séquences de brins antisens disponibles.

2.4.3. La saturation des voies endogènes

Le déclenchement d'un mécanisme endogène, l'ARNi, par des molécules exogènes peut provoquer une saturation des voies naturelles. En effet, l'utilisation de concentrations trop importantes en ARN interférents exogènes peut limiter la disponibilité des complexes multienzymatiques RISC pour d'autres ARN interférents, cette fois-ci endogènes, qui alors auraient pu agir en synergie dans un but thérapeutique commun. La régulation endogène en est restreinte et certains effets protecteurs recherchés moins faciles à obtenir. Par exemple, deux siARN, l'un exogène et l'autre endogène, peuvent être en concurrence pour interagir avec un pool fixe de complexes RISC. Il faut noter qu'une telle compétition n'est constatée qu'à des doses relativement élevées de siARN administrés (dizaines ou centaines de nanomoles) ⁷⁰.

Comme pour les effets aspécifiques décrits précédemment, la réduction des concentrations en ARN interférents injectés permet de limiter la possible saturation des voies endogènes ⁴⁹.

3. Conclusion sur l'induction de l'ARNi de façon exogène

La délivrance d'ARN interférents exogènes, au niveau du compartiment cytoplasmique, est soumise à de nombreux obstacles (Figure 22) qui nécessitent le développement de moyens de transfection innovants ⁷⁰. Ces nouvelles méthodes doivent apporter divers atouts essentiels pour une délivrance efficace.

En dépit d'une internalisation possible *in vivo*, les caractéristiques physico-chimiques des siARN exigent une protection renforcée ainsi qu'une biodistribution contrôlée. Leur sensibilité vis-à-vis des nucléases et le manque de système d'adressage limitent leur utilisation par voie systémique. En outre, la membrane plasmique se présente comme une des barrières à franchir dans la délivrance

intracellulaire. Enfin, la sélectivité de la distribution doit être optimale afin de diminuer les concentrations utilisées en siARN et, par conséquent, limiter les effets indésirables dus à la transfection de courtes séquences d'acides nucléiques ⁴⁹.

À l'heure actuelle, de nombreuses techniques permettant le transport des ARN interférents sont décrites dans l'état de l'art et certaines sont même déjà sur le marché ⁴⁹. Chacune de ces techniques possède des avantages et inconvénients à prendre en considération selon l'application envisagée *in vitro* et/ou *in vivo* (cf deuxième partie).

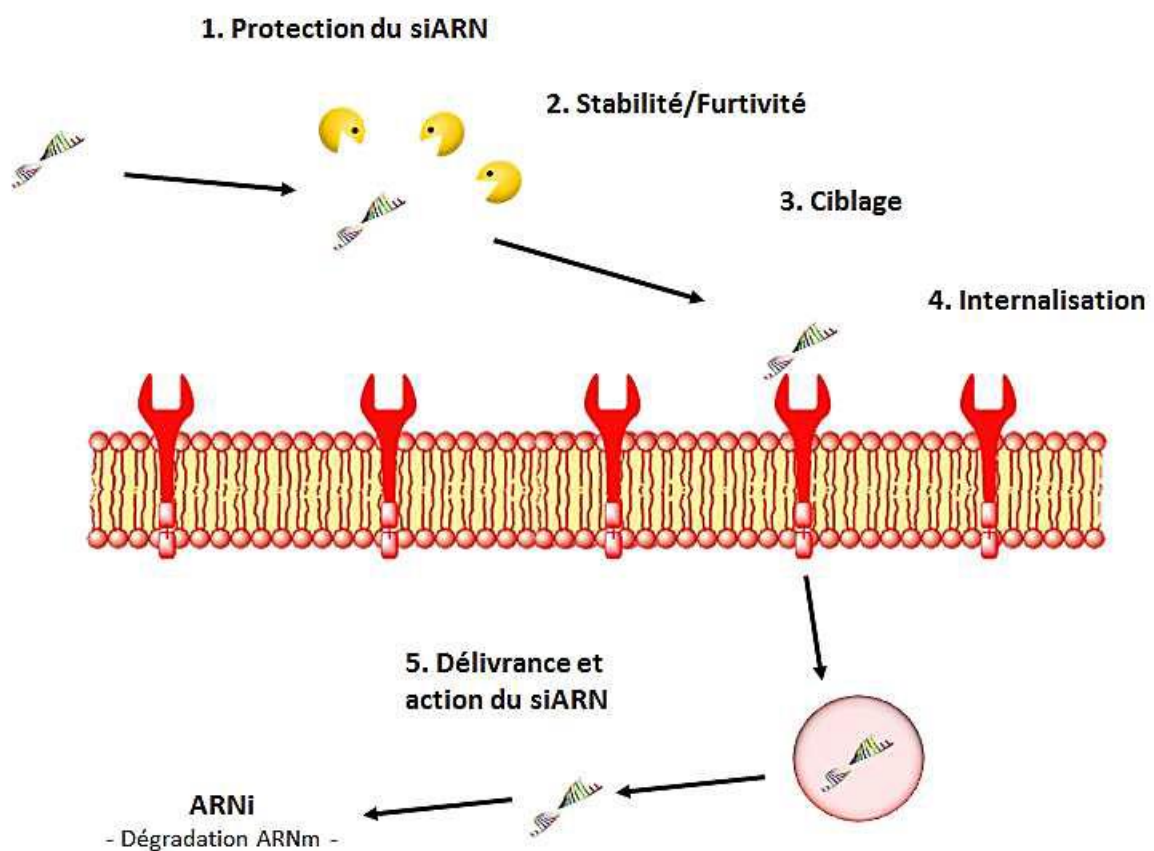


Figure 22 : les différents obstacles à la délivrance de siARN « nus » ; les caractéristiques physico-chimiques des siARN exigent des moyens alternatifs leur permettant de surmonter ces obstacles et d'atteindre le compartiment cytoplasmique ⁴⁹.

Deuxième partie : « De la seringue à la cellule », galénique de l'interférence ARN

Introduction de la deuxième partie

La découverte de l'extinction post-transcriptionnelle médiée par les siARN a permis la conception de nouveaux principes actifs en parallèle des médicaments classiques et des anticorps ¹.

A l'heure actuelle, les principes actifs classiques peuvent être obtenus par synthèse chimique, extraction, mais aussi par criblage moléculaire. Dans ce dernier cas, il s'agit d'un criblage systématique *in vitro* de banques de molécules pour une activité d'intérêt. Des modifications chimiques permettent d'optimiser l'efficacité, la biodisponibilité et l'innocuité des molécules sélectionnées. Par définition, les résultats des criblages sont aléatoires et il peut être très difficile de trouver une molécule ciblant spécifiquement l'effecteur voulu. Le terme effecteur désigne par exemple un organe pouvant agir sous l'influence d'une molécule particulière. En criblage, les principes actifs sélectionnés possèdent le plus souvent une assez faible spécificité, si bien que de nombreux effecteurs sont affectés à des degrés divers par le principe actif administré ¹.

A l'opposé, pour concevoir un siARN thérapeutique, il suffit de connaître la séquence du gène ciblé. En outre, le caractère universel de l'ARNi – n'importe quel siARN introduit dans n'importe quelle cellule est pris en charge par le RISC –

s'oppose à la nécessité, pour les petites molécules, d'atteindre par elles-mêmes des cibles présentes dans des compartiments cellulaires plus ou moins difficiles à atteindre. Enfin, les siARN utilisent des mécanismes d'action spécifiques permettant de cibler idéalement un gène unique ¹.

L'ARNi permet, en théorie, de cibler les ARNm de n'importe quel gène et donc d'inhiber en totalité ou en partie l'expression de ce gène. Toutes les affections dans lesquelles la surexpression d'un ou plusieurs gènes conduit aux symptômes sont des candidates potentielles pour un traitement par ARN interférent. Les gènes ciblés incluent des facteurs de croissance, des oncogènes, des gènes anti-apoptotiques, des gènes viraux ou encore tous les gènes pour lesquels il était jusqu'alors impossible de trouver une molécule inhibant leur expression. Cependant, il faut garder en tête que la stratégie de l'ARNi reste idéale et théorique car de nombreux mécanismes parallèles s'immiscent dans la machinerie cellulaire et inhiber l'expression d'un gène n'est parfois pas suffisant pour soigner efficacement une maladie. Par ailleurs, les ARN interférents ne ciblent que des gènes et réduisent la synthèse des protéines correspondantes. Ils ne peuvent, à l'instar de certaines petites molécules, cibler directement d'autres composés biochimiques, ni modifier l'activité d'une protéine sans en modifier sa quantité ¹.

Malgré tout, les ARN interférents se présentent comme des outils thérapeutiques d'une grande puissance dans le traitement de nombreuses affections.

Parmi les ARN interférents, exploiter par exemple les siARN comme principe actif implique que ceux-ci répondent aux critères d'innocuité et d'efficacité indispensables au développement d'un nouveau médicament. Une fois le gène ciblé défini et le siARN produit, le principal défi reste, dans l'objectif d'une application thérapeutique, de parvenir à transporter les siARN jusque dans les cellules cibles grâce à une préparation médicamenteuse adéquate injectée ou ingérée. La galénique fait ainsi office d'élément primordial à prendre en compte dans le développement d'un médicament utilisant le principe de l'ARNi ¹.

La première partie a mis en avant l'intérêt de la transfection des ARN interférents dans la recherche et le développement de nouvelles thérapies, mais également les

limites concernant la distribution cytoplasmique de ces séquences d'acides nucléiques. Plusieurs paramètres propres à ces molécules ont ainsi été passés en revue : stabilité chimique, taille, pharmacocinétique, biodistribution dans les tissus et accès au RISC. Les effets secondaires potentiellement néfastes inhérents à l'utilisation des siARN ont notamment été exposés. Cependant, de nombreuses techniques ont été développées afin de surmonter ces divers obstacles. La plupart d'entre elles sont dérivées des outils déployés pour la transfection d'ADN, mais restent néanmoins adaptées à la transfection d'ARN interférents, *in vitro* et/ou *in vivo*⁴⁹. En s'appuyant sur l'état de l'art, cette seconde partie a pour but de répertorier les méthodes de transfection existantes pour ces acides nucléiques, définir leurs limites, leurs domaines d'applications, afin d'identifier les besoins actuels et d'y répondre du mieux possible. Ainsi, pour chaque technique de transfection seront discutés les paramètres d'innocuité et d'efficacité de délivrance.

1. Les méthodes de transfection physiques et chimiques

1.1. Les méthodes physiques

Les méthodes de transfection physique regroupent les techniques s'appuyant sur un mécanisme physique de transfert des séquences d'acides nucléiques. Trois sous-classes peuvent être décrites : les méthodes provoquant des perturbations de la membrane plasmique (électroporation, sonoporation,...), les méthodes forçant la transfection d'acides nucléiques (bombardement de gènes), et les techniques de transfert direct dans le compartiment désiré (micro injection)⁴⁹.

1.1.1. Méthode par perturbation des membranes plasmatiques

L'une des techniques envisagées pour favoriser l'accessibilité au cytoplasme consiste à perturber la membrane plasmique de la cellule par des procédés physiques afin de forcer l'internalisation des séquences d'acides nucléiques⁴⁹.

L'électroporation est une méthode très décrite dans la littérature actuelle. La double couche lipidique, formant la membrane de toutes les cellules, est constituée de molécules possédant des charges négatives. Ainsi, la membrane est sensible à l'influence d'un champ électrique appliqué. Au cours d'une impulsion électrique

brève, mais puissante, les molécules lipidiques se réorientent et subissent des phases de transition thermique dues à l'échauffement, entraînant dès lors la création transitoire de milliers de pores hydrophiles dans la membrane cellulaire, pouvant aller jusqu'à 40 nm de rayon, ainsi que des perturbations localisées ¹⁰⁷. La perte temporaire de la semi-perméabilité des membranes cellulaires provoque la fuite du contenu intracellulaire et de molécules tels que les ions et les métabolites. Dans le même temps, une diffusion de diverses molécules extracellulaires est possible : les médicaments, les sondes moléculaires, les acides nucléiques dont les plasmides de tailles relativement importantes ainsi que les siARN (Figure 23). Un exemple de ce type de technique a permis la transfection de siARN régulant l'expression de Pax6 lors d'une étude sur le fonctionnement cellulaire ¹⁰⁸. Lors de cette étude, l'équipe de Balakrishnan *et al.* a internalisé avec succès des siARN dans des cellules INS-1E par électrophorèse en appliquant une à deux impulsions de 15 μ s à 1,5 kV/cm.

En outre, l'efficacité de l'électroporation a également été démontrée dans la délivrance de siARN au sein de cellules difficiles à transfecter, telles que les cellules primaires et en suspension ¹⁰⁸. En effet, Jordan *et al.* ont rapporté des transfections performantes sur une lignée cellulaire en suspension de type Jurkat, sur deux lignées cellulaires de neuroblastome (cellules humaines SK-N-SH, cellules murines Neuro-2A) et sur des cellules primaires de type Huvec. Les résultats ont montré une inhibition de 75 à 95 % de l'expression des gènes ciblés, 4 heures seulement après transfection.

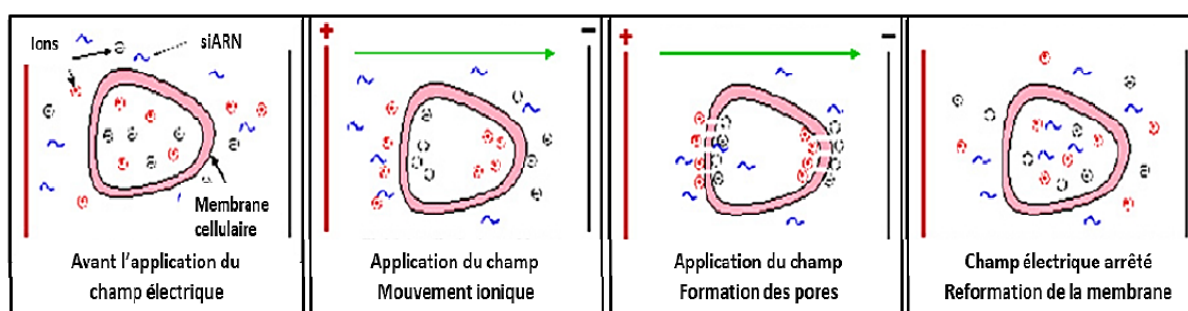


Figure 23 : principe de l'électroporation : un champ électrique entraîne une perturbation de la membrane plasmique suffisante pour créer des pores. La perte d'intégrité de la membrane plasmique autorise des échanges entre les milieux extra- et intracellulaire ⁴⁹.

Néanmoins, l'utilisation de l'électroporation présente certaines limites, notamment en termes de viabilité cellulaire. En effet, cette technique stressante pour les cellules peut endommager leur membrane et parfois les conduire en apoptose ¹⁰⁹. Dans une étude comparative sur les macrophages bovins dérivés de monocytes BMDM (*Bone-marrow-derived macrophage*), Jensen *et al.* ont montré que, dans des conditions optimales, une internalisation des siARN de 60 % était corrélée à plus de 30 % de cytotoxicité ¹⁰⁹.

De la même manière que l'électroporation, la sonoporation permet de changer de manière transitoire la perméabilité de la membrane cellulaire ¹¹⁰. L'effondrement de microbulles par application d'ultrasons libère une énergie, dite de cavitation, responsable de la formation de pores dans la membrane plasmique pouvant aller jusqu'à un maximum de 16 nm de rayon (Figure 24) ¹¹¹. La taille des pores créées est directement dépendante de la taille des microbulles injectées, mais également du temps d'application des ultrasons (Figure 24). Inoue *et al.* décrivent ce principe dans une étude traitant de l'amélioration locale de l'arthrite *in vivo* ¹¹². Une suspension de microbulles de 2 à 3 µm, associées à des siARN, a été injectée au niveau de la patte d'un rat avant l'application d'ultrasons, à une intensité de 2 W/cm² pendant une minute. Les siARN, marqués par un fluorophore, sont ainsi observés dans le tissu synovial après 24 heures, attestant d'une efficacité de transfection ¹¹². La viabilité cellulaire est également affectée avec l'utilisation de la sonoporation ¹¹³. En effet, lors de l'émission continue d'ultrasons sur des cellules murines C166, 75 % de celles-ci sont mortes ou détruites mécaniquement dès l'application d'une puissance de 1,38 W. Avec une émission d'ultrasons discontinue, pour la même puissance, il y a également 50 % de mortalité cellulaire ¹¹³. En outre, le pourcentage de cellules mortes ou détruites augmente avec la puissance, limitant la variation de ce paramètre ¹¹³. Enfin, parmi les cellules vivantes, seulement 25 % témoignent d'une sonoporation efficace dans des conditions optimales.

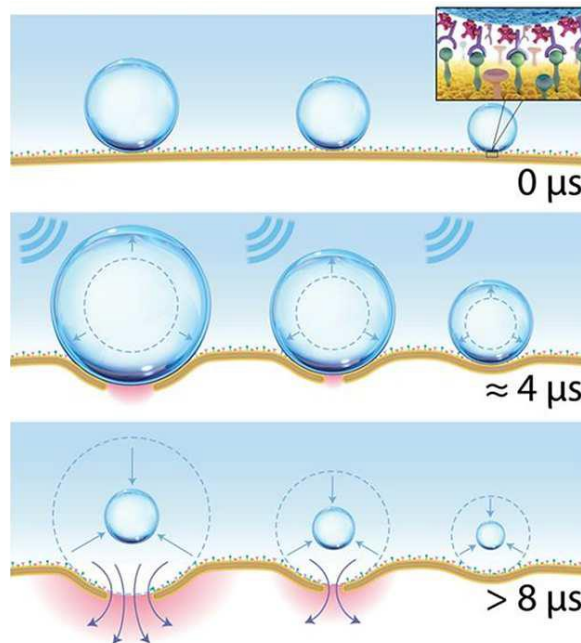


Figure 24 : principe de la sonoporation ¹¹¹.

Les membranes cellulaires peuvent également être perturbées par des techniques d'injection hydrodynamique ¹¹⁴. Cette méthode, uniquement applicable *in vivo*, consiste à injecter rapidement de grands volumes de solution physiologique afin de créer de fortes pressions hydrostatiques ¹¹⁵. Lewis *et al.* ont démontré qu'une injection en intraveineuse (IV) pendant 10 secondes de 2 mL de solution physiologique comprenant 5 μ g de siARN, dans la queue de souris post-natales, permet une inhibition de l'expression du gène ciblé de 80 à 90 % au niveau du foie, des reins, de la rate, des poumons et du pancréas ¹¹⁴.

Cependant, cette technique reste associée à un stress cellulaire et peut provoquer des dommages tissulaires importants ¹¹⁶. Un examen histologique hépatique chez des souris obèses, ayant subies la méthode d'injection hydrodynamique, a révélé des blessures importantes chez celles-ci. Après deux jours, des zones d'hémorragie et d'inflammation périphérique étaient décelées. Après cinq jours, de vastes régions d'inflammation étaient encore visibles. Après huit jours, ces effets significatifs persistaient sur les tissus et la fonction hépatique, témoignant d'un traumatisme majeur chez ces animaux ¹¹⁶.

1.1.2. Biolistique

La délivrance de gènes *via* la biolistique est un mécanisme qui consiste à projeter à très grande vitesse des microbilles métalliques enrobées d'acides nucléiques. Après avoir longtemps été utilisée pour la transfection d'ADN dans les cellules végétales ¹¹⁷, la biolistique a été transposée avec succès pour la transfection de siARN chez des cellules difficiles à transfecter ¹¹⁸. Les travaux de Svarovsky *et al.* se sont appuyés sur l'utilisation de billes d'or de 1,5 µm de diamètre, enrobées de polymères cationiques PEI, auxquelles ont été complexés 300 pmole de siARN d'intérêt ¹¹⁸. Cette expérience a montré qu'un tir de ces particules, à une puissance de 100 psi, permet *in vitro* sur des cellules NIH-3T3 une efficacité d'inhibition de l'expression de la luciférase ciblée de 90 % ¹¹⁸.

Cependant, l'utilisation de la biolistique reste soumise à des contraintes majeures, notamment *in vivo* : en effet, les billes projetées sont progressivement ralenties en traversant les différentes couches cellulaires, entraînant des dommages significatifs sur les cellules et/ou tissus ciblés ^{119,120}. Des expériences effectuées sur des cellules Hela et HEK293 démontrent un traumatisme important de celles-ci dû à la biolistique, matérialisé par leur destruction ou leur entrée en apoptose ¹¹⁹. En outre, la distribution des siARN est limitée quantitativement, avec seulement 30 % d'efficacité de transfection en moyenne avec une hétérogénéité de la distribution des siARN due à la distance variable des cellules bombardées ¹¹⁹.

1.1.3. Micro-injection

La micro-injection de gènes, directement dans le compartiment cytoplasmique, est une méthode de transfection qui permet de s'émanciper de nombreuses limites inhérentes à l'utilisation des siARN. L'utilisation d'un capillaire en verre ultrafin permet d'apporter la séquence d'acide nucléique directement sur le lieu du mécanisme d'ARNi. Ainsi, les limites de stabilité, d'internalisation ou même d'échappement endosomal ne représentent pas d'obstacles ¹²¹. Usui *et al.* ont utilisé ce procédé pour étudier le rôle de *cdc42*, par son inhibition post-transcriptionnelle, dans les adipocytes 3T3-L1 ¹²¹. Lors de cette étude, la translocation du transporteur GLUT-4, autorisée par l'expression de *cdc42*, est diminuée de 65 %, attestant de la délivrance efficace des siARN dans les cellules traitées ¹²¹.

Cependant, ce type de manipulation nécessite de traiter les cellules une par une pour internaliser les siARN. Le traitement d'un nombre suffisant de cellules pour obtenir des résultats significatifs peut exiger un temps de manipulation considérable⁴⁹. Cette méthode de transfection est donc très difficilement reproductible *in vivo*.

1.1.4. Conclusion sur les modifications physiques

Les techniques de transfection physiques qui ont été présentées dans cette sous-partie ont l'avantage d'être non-limitées au type cellulaire étudié. Ainsi, les efficacités de transfection peuvent être rapportées autant sur des lignées immortalisées que sur des cellules difficiles à transfecter⁴⁹.

En dépit de cet avantage, la plupart des méthodes de transfection physique peuvent provoquer un stress cellulaire ; il existe en effet une certaine cytotoxicité évaluée à environ 20 % dans les meilleures conditions rapportées. De plus, l'hétérogénéité de la distribution des siARN prouve un déficit du contrôle de la délivrance⁴⁹. Enfin, la transposition des méthodes physiques du *in vitro* au *in vivo* reste difficile.

Ces limites justifient la nécessité de s'orienter vers d'autres techniques de transfection, dont les caractéristiques offriraient un contrôle plus précis de la distribution et préserveraient l'intégrité des cellules grâce à une innocuité élevée.

1.2. Les méthodes chimiques

Dans la première partie, l'état de l'art a permis d'établir que le simple fait d'utiliser au choix des ARN interférents simples ou doubles brins modifiait l'intensité de l'inhibition⁹. Dès lors, d'autres modifications dans la séquence, ou par conjugaison à d'autres molécules, pourraient permettre d'améliorer les caractéristiques des ARN interférents pour qu'ils résistent mieux aux nucléases et/ou afin de réduire les effets aspécifiques (cf première partie, section IV). Ces changements dans la structure des siARN peuvent s'effectuer à deux niveaux : dans le groupement phosphate ou dans le ribose des nucléotides (Figures 25 et 26).

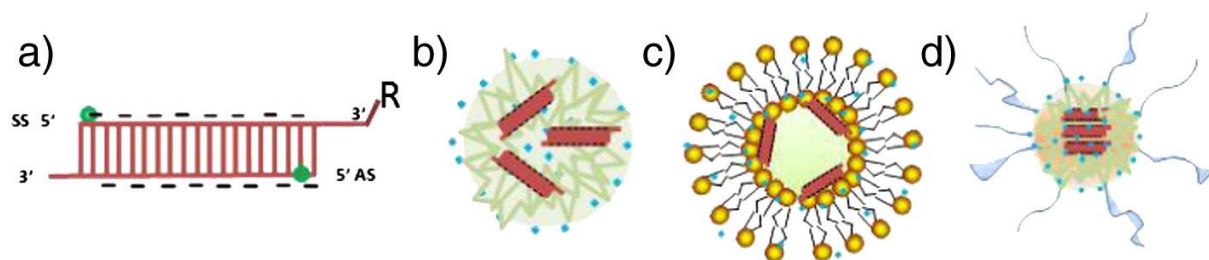


Figure 25 : amélioration de la délivrance des siARN : a) modification chimique du brin de siARN, les spots verts représentent des modifications du ribose ou du phosphate d'un nucléotide. R représente une modification via des molécules (ligands) sur la terminaison du brin de siARN, SS : brin sens, AS : brin antisens ; b) complexation cationique des siARN via des polymères polycationiques ; c) encapsulation des siARN dans un liposome cationique ; et d) vectorisation furtive des siARN dans des particules cationiques ou hydrophobes munies d'une couronne hydrophile, cette dernière conférant aux particules ses propriétés furtives via l'usage de polysaccharides hydrophiles (chitosan, héparine) et/ou de polymères synthétiques (polyvinyle, pyrrolidine, polyéthylène glycol) ⁷⁸.

1.2.1. Modifications intrinsèques des siARN

1.2.1.1. Chimie sur le groupement phosphate

Le phosphate formant le squelette du siARN peut être modifié en substituant la molécule d'oxygène par du soufre (Figure 26-B) ou du borate (Figure 26-C). L'utilisation du soufre améliore légèrement la résistance aux nucléases et augmente l'internalisation dans les cellules sans affecter l'efficacité d'extinction ¹²². L'utilisation du borate, quant à lui, augmente sensiblement la résistance aux nucléases, là aussi en n'altérant pas l'efficacité d'inhibition ¹²³. Cependant, ces modifications peuvent être associées à une cytotoxicité en raison de l'activation aspécifique des voies apoptotiques ¹²⁴.

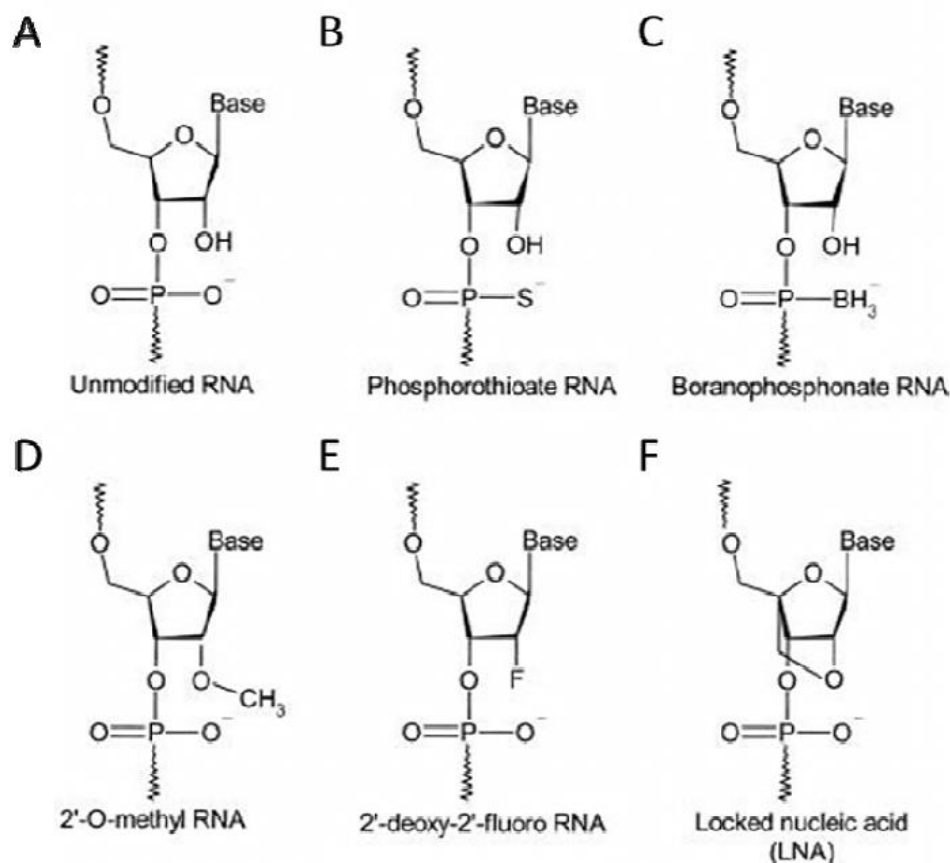


Figure 26 : modifications chimiques introduites dans les siARN : comparaison entre un nucléotide non-modifié (A), avec une modification du phosphodiester (B et C) et une modification du ribose en position 2' (D, E, F) ¹²⁵.

Hall *et al.* ont montré que la transfection de siARN modifiés par un groupement borate, sur des cellules Hela sur-exprimant la protéine GFP (*green fluorescent protein*), permet d'obtenir une inhibition fonctionnelle de celle-ci plus importante qu'avec des siARN non-modifiés ¹²³. En effet, une modification sur 26 % des nucléotides, dont moins de 4 % en position centrale, autorise une inhibition 15 % plus élevée de l'expression de la protéine GFP par rapport à un siARN non-modifié ¹²³. À l'inverse, une modification plus importante en position centrale peut nuire à l'efficacité d'inhibition, probablement en raison d'une altération de la région *seed* (cf première partie, section II). En outre, Hall *et al.* rapportent qu'aucun signe de cytotoxicité n'a été mis en évidence ¹²³. Cependant, en dépit de l'amélioration de l'inhibition, la transfection des siARN, modifiés ou non, était dépendante d'un vecteur lipidique commercial, l'Oligofectamine ¹²³. En effet, ces résultats d'inhibition

fonctionnelle sont issus d'une combinaison entre l'utilisation de vecteurs commerciaux et de modifications chimiques des siARN.

1.2.1.2. Chimie sur le ribose

Au niveau du ribose, les modifications principalement décrites se concentrent sur le carbone en 2' normalement porteur d'un groupement hydroxyle (Figure 26-A). Parmi les substitutions possibles, la présence d'un 2'-O-méthyl (Figure 26-D) montre des caractéristiques intéressantes, notamment pour éviter les effets indésirables mentionnés précédemment (cf première partie, section IV), à savoir l'induction possible de réponses immunitaires, des effets aspécifiques des ARN interférents et la saturation des voies endogènes. La 2'-O-méthylation d'un brin diminue la probabilité de sa sélection comme brin guide : appliquée au brin passager identifié au préalable, elle diminue sa probabilité de chargement dans le complexe multienzymatique RISC, augmentant ainsi l'efficacité du brin guide ¹²⁶. De plus, un positionnement de ce groupement dans la région *seed* diminue à la fois les effets aspécifiques ⁸⁰ et la possibilité de réponse immunitaire non-désirée ¹²⁷. C'est pourquoi cette modification est couramment effectuée lors de la synthèse des siARN disponibles dans le commerce.

Une autre substitution rapportée sur la position 2' du ribose concerne l'insertion de fluor (Figure 26-E). Cette modification, utilisée pour des études *in vivo*, a montré des résultats intéressants dans l'amélioration de l'efficacité d'inhibition et dans la prolongation du temps de demi-vie dans le plasma ⁷⁹. En effet, les études de Layzer *et al.* rapportent un maintien complet de l'intégrité des siARN, modifiés par du fluor, dans le plasma humain après une heure d'incubation ; dans le même temps, des siARN n'ayant subi aucune modification sont totalement dégradés ⁷⁹.

L'une des modifications chimiques les plus décrite dans la littérature est celle des siARN qui deviennent des acides nucléiques bloqués (*locked nucleic acid* ou LNA) (Figure 26-F). Les LNA sont caractérisés par une liaison 2'-O-méthyl-4' qui permet une augmentation considérable du temps de demi-vie dans le sérum : jusqu'à 90 heures avec des siARN modifiés, contenant entre 14 et 43 % de ces groupements, pendant que les siARN non modifiés sont dégradés après 5 minutes ¹²⁸. Cependant, cette modification nécessite d'être contrôlée afin de ne pas perturber la prise en

charge par les enzymes du complexe RISC ¹²⁸. La solution la plus adéquate consiste à concentrer les modifications sur le brin sens (ou passager) pour favoriser la sélection du brin antisens (ou guide) par la protéine Argonaute 2 ³⁶. Par ailleurs, la composition des séquences des LNA doit être totalement maîtrisée pour ne pas induire d'effet inhibiteur sur des miARN naturels, par effet stérique essentiellement.

1.2.2. Conjugaison à d'autres molécules

Les extrémités des siARN peuvent également être modifiées grâce à la liaison de ligands permettant d'améliorer leurs propriétés. Cependant, le greffage de ce type de molécule doit préférentiellement être effectué au niveau du brin sens afin de ne pas entraver le mécanisme d'ARNi ¹²⁹. En effet, le rôle essentiel du brin antisens dans la reconnaissance de l'ARNm cible limite les modifications pouvant être apportées sur ce brin. Néanmoins, le greffage de molécules sur le brin antisens reste possible en position 3', mais fortement dépendant de la nature du groupement choisi. Par exemple, un groupement biotine n'altère pas l'efficacité d'inhibition post-transcriptionnelle mais un groupement hydroxyéthylphosphate entraîne une perte d'efficacité ^{130,131}. Ainsi, plusieurs familles de groupements peuvent être sélectionnées pour une conjugaison sur le brin sens préférentiellement.

1.2.2.1. Groupements lipophiles

Le principe est de synthétiser des siARN conjugués à des dérivés lipophiles (tel que le cholestérol) : la partie lipidique se lie de manière covalente avec une des extrémités du brin sens (Figure 27) ¹³², favorisant ainsi le passage de la membrane plasmique hydrophobe.

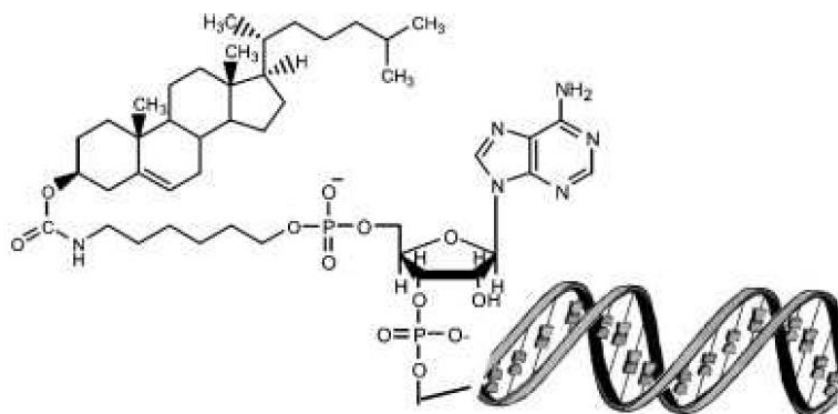


Figure 27 : conjugaison à un groupement lipophile : une liaison covalente entre le brin sens et une molécule de type cholestérol ou dérivé stéroïde permet d'augmenter l'internalisation et favorise le ciblage de cellules spécifiques ¹³².

Le cholestérol et ses analogues s'avèrent être des ligands intéressants pour le ciblage du foie en raison de la présence de récepteurs sur les hépatocytes permettant l'endocytose du cholestérol ¹³². En complément d'un ciblage amélioré, la conjugaison à ce type de molécule lipophile permet de stabiliser les siARN *in vivo*, jusqu'à 30 minutes, en diminuant leur clairance rénale ^{130,133}. Les résultats positifs obtenus avec le cholestérol ont ouvert la voie à des tests utilisant d'autres molécules lipophiles, tels que les acides gras ou les acides biliaires ¹³⁴. Il a été observé que la liaison des siARN à ces molécules permet de cibler les hépatocytes *via* leurs récepteurs HDL (*High Density Lipoprotein*), et ainsi de favoriser l'internalisation dans ce modèle cellulaire. Afin d'illustrer cet effet, Lorenz *et al.* démontrent une efficacité d'inhibition de 46 % après transfection de siARN, modifiés en 3' du brin sens par du cholestérol, sur des lignées cellulaires d'hépatome Huh-7 ¹³².

D'autres molécules lipophiles peuvent être associées de manière covalente aux siARN, notamment certaines vitamines. Par exemple, la biotine B8 (vitamine A) ou l' α -tocophérol (vitamine E) peuvent être cités (Figure 28), ce dernier permettant également le ciblage des hépatocytes ¹³⁵. Nishina *et al.* se sont appuyés sur la conjugaison d' α -tocophérol sur des siARN ciblant l'apolipoprotéine B (apoB) se trouvant dans les cellules du foie de souris ¹³⁵. L'injection de 32 mg/kg de ces siARN

modifiés a induit une inhibition à 80 % de l'expression de l'ARNm codant pour l'apoB deux jours après traitement, sans avoir recours à un autre outil de transfection ¹³⁵.

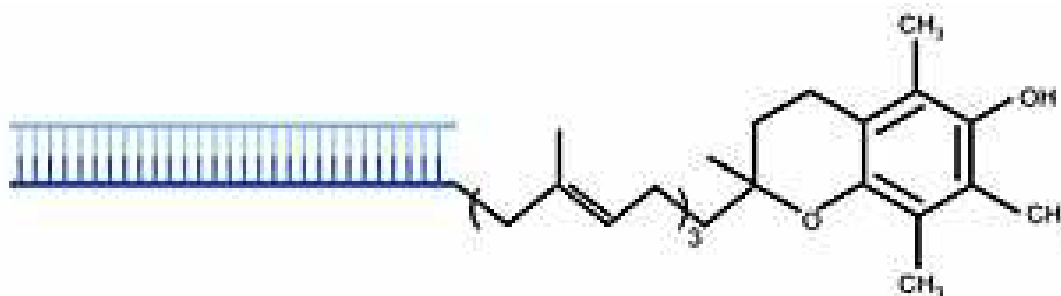


Figure 28 : conjugaison à la vitamine E : une liaison covalente entre le brin sens et l' α -tocophérol a permis de cibler spécifiquement les hépatocytes ¹³⁶.

1.2.2.2. Groupements aptamères

Les groupements aptamères sont des oligonucléotides synthétiques d'ADN ou d'ARN de 20 à 50 nucléotides qui peuvent se fixer spécifiquement et avec une grande affinité sur une cible. De par les banques importantes d'ARN existantes, de nombreux aptamères différents peuvent être générés pour se fixer à des récepteurs de nature très variée, grâce à l'acquisition d'une conformation spatiale finement définie et contrôlée ⁹⁸. Des exemples utilisant ce type de conjugaison sont décrits dans la littérature : les travaux de McNamara *et al.* s'appuient sur des aptamères se fixant spécifiquement sur les antigènes membranaires PSMA (*Prostate-Specific Membrane Antigen*) des cellules de la prostate, fortement exprimés par les cellules tumorales prostatiques ¹³⁷. L'injection intra-tumorale de siARN conjugués à cet aptamère, visant l'extinction du gène PLK1 (*polo-like kinase 1*) surexprimé dans les tumeurs humaines, permet une inhibition majeure de la croissance tumorale prostatique sur les souris traitées ¹³⁷. En effet, sur un modèle de xénogreffe de souris exprimant PSMA, le volume de la tumeur mesurée passe de 0,7 cm³ avec un siARN contrôle à un volume de 0,1 cm³ avec le siARN ciblant PLK1 ¹³⁷. En outre, l'utilisation de siARN ciblant PLK1 sur un modèle de xénogreffe de souris n'exprimant pas PSMA ne permet pas l'inhibition de la croissance tumorale ¹³⁷.

Ainsi, la simplicité de synthèse et la forte spécificité des aptamères les présentent comme une alternative intéressante pour l'adressage des siARN.

1.2.2.3. Groupements peptidiques

Certaines séquences peptidiques d'environ trente acides aminés et de charge positive, appelées peptides de pénétration cellulaire (*PPC*), peuvent initier le passage de la membrane cellulaire. Ces PPC peuvent aussi bien être associés aux siARN par des liaisons électrostatiques que par des liaisons covalentes. Des études *in vitro* ont montré que les siARN, liés aux PPC par une liaison labile, sont libérés dans le compartiment cytoplasmique sans qu'il y ait besoin par ailleurs d'une grande quantité de ces peptides ¹³⁸. Ainsi, Muratovska *et al.* démontrent une inhibition forte de la GFP grâce à la transfection de siARN, conjugués à des peptides de type pénétratine ou transportan, ciblant la GFP surexprimée chez des cellules murines. Après 7 jours d'incubation, les cellules EOMA-GFP (lignée cellulaire cancéreuse, hémangioendothéliome malin) et C166-GFP (lignée cellulaire immortalisée) présentent une inhibition respective de 80 % et 86 % avec le siARN conjugué à la pénétratine, et de 97 % et 68 % avec le siARN conjugué au transportan ¹³⁸.

1.2.3. Conclusion sur les modifications chimiques

Les modifications chimiques intrinsèques des siARN offrent plusieurs avantages : elles permettent d'obtenir des molécules plus stables ^{98,139} ainsi que de diminuer les effets indésirables inhérents à l'utilisation de siARN synthétiques ^{98,140} (cf première partie, section IV). Parmi ces modifications, l'usage des LNA représentent une alternative de plus en plus utilisée dans les études sur l'ARNi ¹⁴¹. Néanmoins, les modifications chimiques nécessitent d'être finement contrôlées afin de ne pas interférer avec le mécanisme d'ARNi et donc de diminuer son efficacité. En outre, en dépit de l'amélioration des propriétés des siARN permise par les modifications de leur structure, les modifications intrinsèques ne permettent pas des transfections efficaces sans outils alternatifs tels que des vecteurs ⁴⁹.

Les modifications par conjugaison de molécules, sur le brin sens des siARN, peuvent favoriser la délivrance d'ARN interférents indépendamment de l'utilisation de vecteurs. De plus, cette distribution peut présenter l'avantage d'être très spécifique selon la nature de la molécule greffée ¹³⁷. Cependant, cette stratégie peut rapidement devenir fastidieuse. En effet, chaque type de siARN utilisé doit être modifié chimiquement et purifié par des procédés de chromatographie, des étapes contraignantes dans le cadre d'applications à grande échelle (criblage à haut-débit).

En outre, une conjugaison adaptée seulement à certains modèles cellulaires limite d'autant plus son utilisation pratique ⁴⁹.

1.3. Conclusion sur les transfection physiques et chimiques

Les méthodes de transfection physiques et chimiques, ne s'appuyant pas sur l'utilisation des vecteurs, présentent des caractéristiques particulières qui leur attribuent des applications privilégiées (Tableau 2). Ainsi, les applications de transfection existantes ont été définies suivant quatre catégories qui représentent des enjeux majeurs dans le domaine de la transfection : la transfection *in vitro*, la transfection *in vivo*, la délivrance d'ARN interférents dans les cellules difficiles à transfecter et les applications de criblage à haut-débit ⁴⁹.





	Modifications physiques		Modifications chimiques	
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Non-dépendantes du type cellulaire - Favorisation de l'internalisation 		<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration des propriétés des siARN (stabilité, protection, ...) - Sélectivité de la distribution (conjugaison) 	
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Stress pour les cellules (mortalité, apoptose, ...) - Manque de contrôle de la distribution (hétérogénéité) - Difficulté du processus 		<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité d'un contrôle précis de la modification pour ne pas altérer l'efficacité - Non-adaptées pour les campagnes expérimentales importantes (avec différents siARN et sur différentes cellules) - Difficulté du processus 	
Applications possibles		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> - Cellules difficiles à transfecter - <i>In vivo</i> Limité – sonoporation Ex vivo privilégié 		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> Conjugaison (limité à certains organes) - <i>In vivo</i> Conjugaison (limité à certains organes)
		<ul style="list-style-type: none"> - Criblage haut-débit - <i>In-vivo</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Criblage haut-débit - Cellules difficiles à transfecter

Tableau 2 : comparaison des méthodes de transfection physiques et chimiques : chaque méthode présente des caractéristiques définissant son domaine d'application privilégié ⁴⁹.

2. Les nanovecteurs pour la transfection des ARN interférents

Bien que les méthodes de transfection physiques et chimiques présentent des avantages certains, l'utilisation des vecteurs demeure une alternative intéressante. En effet, les familles de vecteurs qui existent actuellement proposent des caractéristiques différentes des méthodes précédemment présentées. Ces familles (viraux, inorganiques, polymériques, peptidiques et lipidiques) vont être maintenant développées afin d'évaluer leurs qualités, leurs limites, ainsi que les applications envisagées grâce à leur utilisation.

2.1. 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 1000 nm. Cette définition comprend donc les nanoparticules (*NP*), les nanofibres ou nanotubes et les nanofeuillets. Une, voire deux des dimensions externes de ces deux derniers types de nano-objets peuvent aller jusqu'à quelques millimètres, tandis que la ou les autres dimensions sont à l'échelle nanométrique ¹⁴².

2.2. Objectifs de la vectorisation

Un des objectifs recherchés dans la vectorisation des ARN interférents est de rendre ces oligonucléotides suffisamment stables au sein de l'organisme pour leur éviter une dégradation rapide dans la circulation sanguine. L'amélioration de leur adressage grâce à la vectorisation peut permettre aussi d'éviter leur élimination prématurée. Le vecteur idéal doit répondre aux critères suivants ¹⁴³ :

- Il doit être facile à produire à l'échelle industrielle par des méthodes simples et sécurisées. Il doit également être le moins onéreux possible.
- Il doit être non immunogène et permettre ainsi des administrations répétées.

- Il doit être spécifique des cellules cibles visées.
- Il doit pouvoir s'adapter à la taille de l'oligonucléotide à transporter.
- Il doit être internalisé par les cellules et permettre la libération de l'oligonucléotide dans la cellule (phénomène de transfection).
- Il doit se dégrader et s'éliminer facilement de l'organisme ¹⁴⁴.

Actuellement, le vecteur idéal n'existe pas malgré de nombreuses recherches dans le domaine. Un vecteur adapté nécessite d'être choisi suivant le type d'oligonucléotide à transporter (taille, interactions vecteur-ARN...) ¹⁴⁴.

Il existe deux principaux types de vecteurs : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les plus utilisés à l'heure actuelle sont les vecteurs viraux car leur efficacité à insérer l'information génétique est encore, pour le moment, bien meilleure à celle des vecteurs non-viraux ou synthétiques. Cependant, ils présentent de nombreux inconvénients et les recherches concernant les vecteurs non-viraux sont donc nombreuses ¹⁴⁴.

2.3. Les vecteurs viraux pour la transfection des ARN interférents

Utilisés depuis plus de 20 ans dans le cadre de la thérapie génique, les vecteurs viraux ont récemment été appliqués à l'ARNi afin de délivrer dans les cellules des virus permettant l'expression endogène d'ARN interférents ².

Le recours à des virus pour transporter des acides nucléiques repose sur le constat de l'efficacité de ceux-ci à transférer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines ^{2,145}. Pour produire des vecteurs viraux, on utilise des virus modifiés génétiquement, dits sécurisés. Le principe consiste à éliminer les séquences du virus codant pour certaines protéines, notamment celles associées à un éventuel comportement pathogène du virus, et à ne conserver que celles qui sont utilisées pour construire la particule virale, et assurer le cycle d'infection. Le génome du virus est alors modifié pour porter les séquences permettant l'expression des ARN interférents.

Les vecteurs viraux sont des systèmes de transfection très efficaces, mais leur application clinique est freinée par certains inconvénients ^{2,146}. Ils peuvent induire

des réponses immunitaires et/ou s'intégrer de façon aléatoire dans le génome hôte. De plus, leur production s'avère relativement complexe et coûteuse.

Néanmoins, un certain nombre d'approches virales ont été étudiées chez les primates et les humains. Ces approches sont regroupées selon cinq types de vecteurs viraux, construits pour exprimer par exemple des ARN en épingle à cheveux. Cela permet d'initier une inhibition à long terme de l'expression des gènes cibles, caractéristique importante dans le traitement des infections chroniques ².

2.3.1. Les différentes classes de vecteurs viraux

2.3.1.1. Rétrovirus

Les rétrovirus font partie des premiers vecteurs à avoir été utilisés pour transfecter des ARN en épingle à cheveux dans des cellules. Ainsi, ils appartiennent à la grande famille des virus à ARN. Lors de l'infection, le génome connaît une étape de rétro-transcription en un fragment d'ADN qui sera ensuite intégré aux chromosomes. L'information génétique désirée se trouve alors insérée dans le génome de la cellule cible, le nouveau gène se transmettant des cellules mères aux cellules filles ².

Une étude de Brummelkamp ^{2,147}, utilisant des rétrovirus (retroviral pRETRO-SUPER RNA interference vector), a démontré la grande spécificité du concept d'ARNi et de son intérêt en cancérologie.

Alors que les rétrovirus sont très efficaces *in vitro*, ils souffrent de plusieurs inconvénients pour être appliqués *in vivo*, et plus spécialement en clinique chez l'Homme ^{2,148}.

En effet, compte tenu du mode d'intégration dans le génome hôte, leur sécurité d'emploi n'est pas totale : il existe un risque d'insertion mutagène, et potentiellement carcinogène. Trois patients d'un essai clinique de thérapie génique (transfert d'ADN), utilisant ces rétrovirus pour traiter le syndrome d'immunodéficience sévère lié à l'X, ont développé des leucémies ^{2,149}. Ceci explique la faible utilisation des vecteurs rétroviraux *in vivo* et pourquoi les autres types de vecteurs sont favorisés dans les expérimentations d'ARNi. Une limitation supplémentaire à l'utilisation des rétrovirus vient du fait qu'ils sont efficaces seulement sur les cellules en division. La plupart des cellules mammifères ne se divisent pas et les rétrovirus ne peuvent donc les atteindre.

2.3.1.2. Lentivirus

Les lentivirus sont des virus à ARN qui se sont révélés très attrayants en tant que vecteur de transfection pour des applications *in vivo*. Bien que des problèmes de sécurité d'emploi existent également, ce type de virus est dénué de la plupart des inconvénients rencontrés avec les rétrovirus ¹⁵⁰. En effet, il n'y a que peu de risque d'insertion mutagène et les lentivirus sont capables de transfecter efficacement aussi bien des cellules primaires que des cellules quiescentes. De plus, les lentivirus sont capables d'incorporer de grandes quantités de matériel génétique et ne sont que faiblement immunogènes. Les lentivirus ont principalement été utilisés pour des applications locales, et leur capacité à transfecter des cellules quiescentes, tels que les neurones, font de ces virus un système de qualité pour des applications au niveau du système nerveux ².

Ils ont ainsi été utilisés avec succès pour réguler des gènes cibles du cerveau après leur injection locale ^{151,152}. L'équipe de Singer a utilisé des vecteurs lentiviraux sur un modèle murin exprimant la maladie d'Alzheimer. Ils ont ciblé un gène impliqué dans le clivage des précurseurs de l'amyloïde, et ont obtenu une réduction de la formation des plaques typiques de la maladie ^{2,153}.

D'autre part, suite à une injection intramusculaire, le lentivirus EAIV, virus de l'anémie infectieuse équine, a été capable d'infecter des motoneurones spinaux. Il a été utilisé sur un modèle murin exprimant la sclérose latérale amyotrophique, et a permis de retarder l'apparition des symptômes de la maladie, tout en augmentant la survie des animaux ^{2,150}.

2.3.1.3. Adénovirus

Il s'agit d'un virus à ADN capable d'introduire son matériel génétique sans attendre la mitose cellulaire, et sans insérer la nouvelle information génétique dans le génome de la cellule cible. L'information génétique est donc extra-chromosomale, mais cela implique qu'elle est conservée de manière moins stable dans les cellules et peut être perdue durant les divisions cellulaires successives. Les adénovirus font figure de vecteurs adéquats pour toutes les applications où un effet transitoire reste suffisant (par exemple, en thérapie génique anti-tumorale) ².

Les vecteurs adénoviraux sont très utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique, puisqu'on les retrouve actuellement dans environ 25 % d'entre eux ^{2,154}.

Dans la littérature, on retrouve également de nombreux articles décrivant l'utilisation de ce type de vecteurs pour l'application thérapeutique de l'ARNi *in vivo*.

La première étude d'ARNi ayant utilisé un vecteur adénoviral *in vivo* a été publiée en 2002 et avait comme applications le système nerveux central (SNC) ^{2,155}. Chez une souris transgénique exprimant la GFP, Xia *et al.* ont obtenu une extinction de cette protéine dans le cerveau, suite à l'injection locale d'adénovirus.

Afin d'utiliser l'ARNi en thérapeutique anti-cancéreuse, de nombreuses équipes ont testé *in vitro* des vecteurs adénoviraux exprimant des ARN en épingle à cheveux. Toutes ont eu recours à des injections locales au niveau de tumeurs sous-cutanées dans le but de stopper leur croissance. Une grande variété d'oncogènes a été ciblée dans différents types de tumeurs, et une réduction de la croissance tumorale a très souvent été obtenue dans ces études ^{2,156–159}.

Il n'existe qu'un nombre limité d'études rapportant l'utilisation systémique des vecteurs adénoviraux pour l'ARNi *in vivo*. Une de ces études a été réalisée grâce à l'injection en IV d'un adénovirus contenant une construction ciblant la β -glucuronidase murine. Suite à l'infection, l'expression de celle-ci au niveau du foie s'en est trouvée diminuée ¹⁵⁵. Néanmoins, l'hépatotoxicité des adénovirus, limitant leur dose thérapeutique en IV, et leur manque de spécificité cellulaire, nécessite de développer de nouvelles stratégies afin d'améliorer le tropisme cellulaire ou tissulaire de ces vecteurs viraux. Une nouvelle génération de vecteurs adénoviraux pour la thérapie génique *in vivo* a vu le jour, offrant des perspectives prometteuses dans l'application ciblée de l'ARNi. Grâce au génie génétique, des changements au niveau de la capsid adénovirale, et ce à des fins de tropisme optimisé, ont permis de considérablement élargir les applications des adénovirus en thérapie génique. En effet, ces derniers se voient octroyer de nouvelles capacités qui leur permettent un meilleur ciblage *in vivo* ^{2,160}.

2.3.1.4. Virus adéno-associé (VAA)

Ce type de vecteur viral à ADN semble prometteur afin de délivrer des ARN interférents et présente certains avantages. En effet, on ne lui connaît aucune pathogénicité, et il peut être appliqué à un large spectre de cellules cibles, incluant les cellules quiescentes ². De nombreuses publications rapportent le succès de son utilisation *in vitro* ^{161,162}. Cependant, peu d'études *in vivo* existent, ces vecteurs viraux ayant seulement été utilisés par injection locale au niveau du cerveau ^{163,164}.

Par exemple, Xia *et al.* ont démontré dans un modèle d'ataxie spinocérébelleuse que grâce à l'ARNi, la neurodégénérescence induite par la polyglutamine pouvait être réprimée. Après injection intracérébelleuse, des vecteurs recombinants à base de VAA et exprimant des shARN ont considérablement amélioré la coordination motrice, ainsi que restauré la morphologie cérébelleuse de souris SCA1 (*spinocerebellar ataxia type 1*)^{163,164}.

Malgré cela, la connaissance de l'apport des adénovirus en tant que méthode de transfection pour l'ARNi *in vivo* demande à être approfondie².

2.3.1.5. Baculovirus

Le baculovirus, virus d'insecte présentant plusieurs avantages, a connu déjà ses premières phases d'essai en tant que vecteur potentiel d'ARNi *in vivo*^{2,150}. Son premier intérêt est qu'il peut contenir de grandes quantités d'informations génétiques. Il peut donc être utilisé à la fois comme vecteur en thérapie génique, et comme vecteur d'inhibition de l'expression de gènes *via* l'ARNi. Le second avantage de ce virus est sa potentielle sécurité d'utilisation car il est incapable de se répliquer et d'exprimer des protéines virales dans les cellules mammifères.

Dans une étude sur un modèle animal, Ong *et al.* sont parvenus à diminuer l'expression du gène de la luciférase dans le cerveau de rats, après co-injection d'un baculovirus comportant un plasmide codant pour la luciférase et un vecteur de shARN ciblant cette même protéine^{2,165}.

2.3.2. Conclusion sur les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux possèdent une efficacité de transfection élevée et c'est pourquoi ils sont utilisés dans 70 % des essais cliniques (thérapie génique incluse) testant des acides nucléiques. Cependant, ils possèdent pour la plupart des inconvénients majeurs qui sont¹⁴⁴ :

- La production en grande quantité

La production de masse de ce type de vecteur est très difficile pour des raisons de biosécurité. De plus, les rendements sont souvent assez faibles et le coût de production important.

- La réponse immunitaire

L'inconvénient majeur de ces vecteurs est lié à leur nature virale. En effet, les virus activent le système immunitaire de défense de l'organisme, souvent de manière aléatoire ¹⁴⁴.



	Vecteurs viraux	
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Non-dépendants du type cellulaire - Forte infection et forte délivrance de siARN 	
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Risques immunogènes/oncogènes - Cytotoxicité associée (Adénovirus et AAV) - Limitations pour le transfert clinique - Production et industrialisation 	
Applications possibles		- Cellules difficiles à transfecter
		<ul style="list-style-type: none"> - Criblage haut-débit - <i>In vivo</i> Transfert clinique limité - <i>In vitro</i> Industrialisation limitée

Tableau 3 : caractéristiques des vecteurs viraux ; ils possèdent certains avantages leur autorisant une infection efficace, mais aussi des contraintes qui limitent leur utilisation ⁴⁹.

Il est difficile de savoir si les améliorations continues de ces vecteurs viraux pourront remédier aux problèmes inhérents à leur nature. C'est pourquoi de nombreux vecteurs non-viraux sont développés en parallèle.

2.4. Les vecteurs synthétiques pour la transfection des ARN interférents

2.4.1. Généralités sur les vecteurs synthétiques

De par leurs propriétés physico-chimiques, les vecteurs synthétiques apparaissent comme une alternative attrayante pour la délivrance intracellulaire de séquences d'acides nucléiques. Utilisées pour la vectorisation de principe actif ^{166,167} ou d'ADN ¹⁶⁸, la communauté scientifique se concentre depuis quelques années sur l'intérêt des NP pour la transfection des siARN. Ainsi, le nombre de publications portant sur la délivrance de siARN *via* l'utilisation des NP est en croissance constante depuis 2004 (Figure 29). Au regard des recherches, les vecteurs inorganiques (vecteurs de structure métallique) semblent représenter la famille de NP la moins étudiée pour la transfection des siARN, ne dépassant pas les 1000 publications par an. Au contraire, les NP lipidiques, peptidiques et surtout polymériques, semblent être au cœur de l'attention, en atteste le nombre important, et croissant, de publications qui les citent (Figure 29).

Chaque famille de particules présente des caractéristiques (chimiques, physico-chimiques) qui lui est propre et ces caractéristiques déterminent les applications dans lesquelles les particules d'une même famille sont utilisées de manière privilégiée ¹⁶⁹. Ainsi, les propriétés physicochimiques, la taille, la charge et les autres propriétés de surface sont dictées par les types, les structures, les orientations et le mode de fabrication des matériaux qui composent la NP. Chaque élément doit être pris en considération lors de la conception afin d'optimiser les effets obtenus.

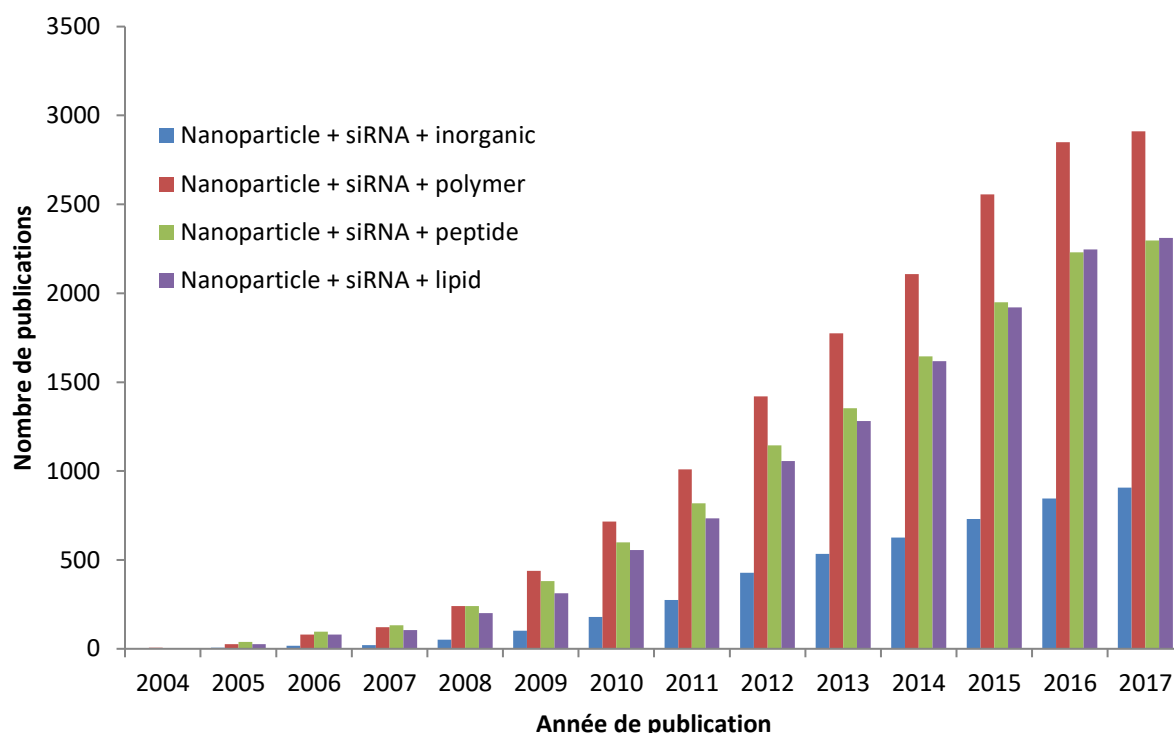


Figure 29 : Evolution du nombre de publications se rapportant à l'utilisation de particules non-virales pour la transfection de siARN. D'après des recherches, par mots-clés (cf légende), effectuées sur Scopus en août 2018.

Tout d'abord, la maîtrise des propriétés de surface est déterminante, notamment en termes de polarité. En effet, il apparaît que la polarité influence considérablement l'interaction de la particule avec la membrane plasmique et les protéines sériques également chargées négativement. Ainsi, une particule présentant des charges positives facilite non seulement son internalisation par association avec la membrane de la cellule ¹⁷⁰, mais également son association avec les siARN chargés négativement. Des charges positives permettent également la déstabilisation de l'endosome par « appariement ionique » et/ou « effet pompe à proton » ⁹⁴ (cf première partie, section IV). En revanche, ces charges provoquent une fixation plus importante aux protéines sériques ce qui peut entraîner une diminution de l'efficacité de transfection ⁸⁰. Ces propriétés de surface peuvent aussi être optimisées par insertion de certains excipients ou polymères sur la particule. En particulier, l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) conjugué aux NP, quel que soit leur type, est devenu une stratégie majeure dans leur conception car il confère protection et furtivité ¹⁷¹. Cependant, cet encombrement peut également interférer dans les mécanismes

d'internalisation des NP car le PEG peut masquer les composés chargés positivement, réduisant alors les interactions entre les charges cationiques potentielles des NP et les phospholipides de la membrane.

L'utilisation de vecteurs pour la délivrance d'ARN interférents exige de maîtriser certaines caractéristiques essentielles (taille, charge de surface, ciblage) afin de transporter efficacement les acides nucléiques, de les protéger des dégradations, de faciliter leur passage à travers la membrane plasmique et de favoriser leur délivrance cytoplasmique ⁴⁹. Plus loin dans cette partie, un état de l'art des différentes familles de vecteurs utilisées pour la transfection des ARN interférents sera réalisé, en mettant en évidence notamment leurs avantages et inconvénients au regard des applications envisagées.

2.4.2. Propriétés physico-chimiques des nanovecteurs d'ARN interférents

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

- Extracellulaires :
 - Reconnaissance et opsonisation des nanovecteurs par les protéines plasmatiques si processus de l'immunité adaptative engagé ;
 - Reconnaissance et phagocytose par le système réticulo-endothélial des nanovecteurs opsonisés si processus de l'immunité adaptative engagé ;
 - Clairance rénale ;
 - Difficulté de transport et d'adressage des nanovecteurs jusqu'au tissu cible en cas de distribution aspécifique.
- Cellulaires :
 - Interaction avec la membrane cellulaire et internalisation ;
 - Echappement endosomal ¹².

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 ¹⁷².

2.4.2.1. Influence de la taille des nanovecteurs

La taille des nanovecteurs conditionne leur demi-vie et leur 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 par le système réticulo-endothélial. Ainsi, le choix de nanovecteurs de taille comprise entre 50 et 250 nm peut favoriser le prolongement de leur circulation dans l'organisme par réduction de l'excrétion rénale et de l'opsonisation ¹⁷².

De plus, la taille joue un rôle dans l'accumulation des nanovecteurs dans certains tissus et leur internalisation cellulaire. Les NP, toujours de taille comprise entre 50 et 250 nm, s'accumulent de manière passive dans les tissus ayant une perméabilité vasculaire élevée, tels que certains tissus tumoraux et inflammatoires.

2.4.2.2. Influence de la charge de surface

La charge des nanovecteurs conditionne leur interaction avec les ARN interférents d'une part, et avec les protéines biologiques de l'organisme d'autre part. Une charge positive est nécessaire pour créer une liaison électrostatique avec les siARN polyanioniques. En revanche, la charge de surface des nanovecteurs ne doit pas être trop prononcée. Une charge de surface très positive entraîne une reconnaissance par les protéines plasmatiques chargées négativement (e.g l'albumine) et une élimination rapide 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 ¹⁷².

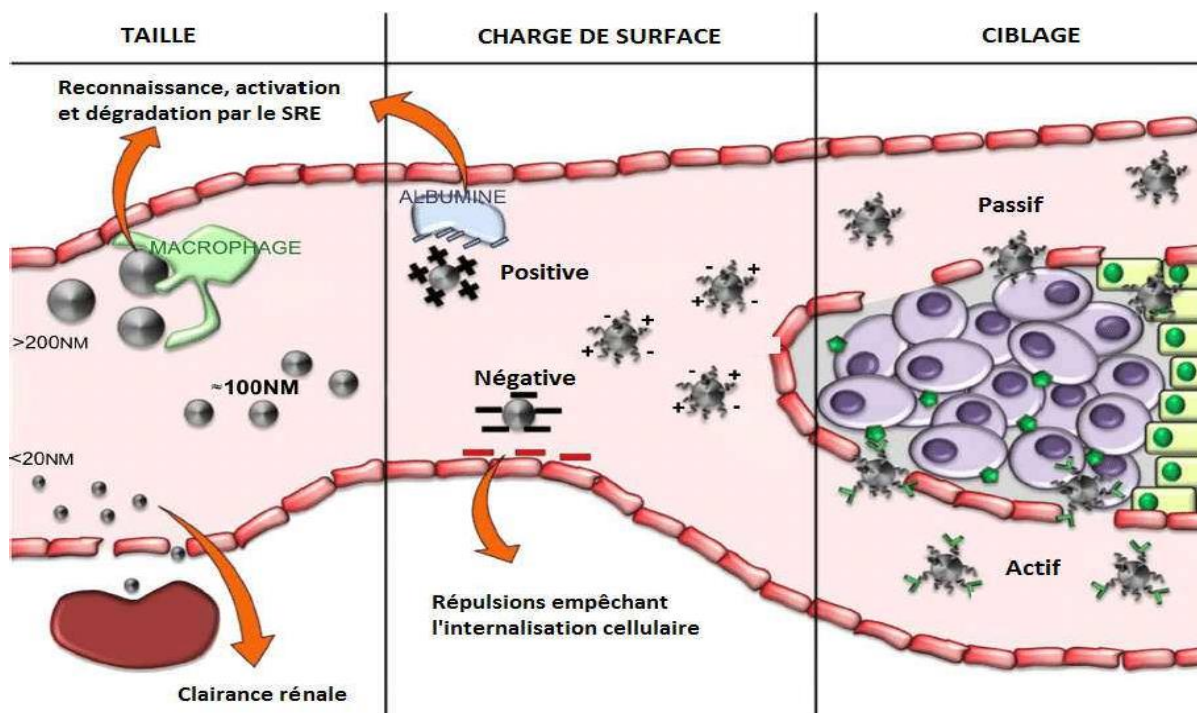


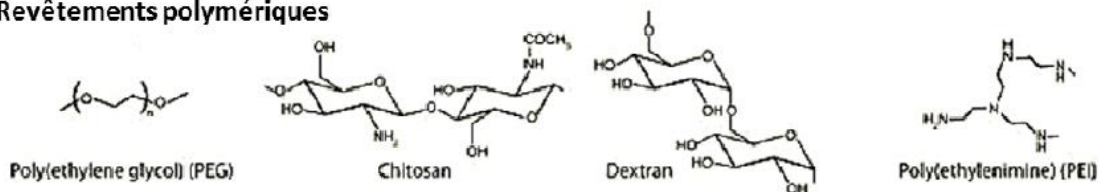
Figure 30 : facteurs influençant la biodistribution des nanovecteurs ¹⁷².

2.4.3. Les différentes classes de vecteurs synthétiques

2.4.3.1. Les vecteurs inorganiques

Cette classe de NP s'appuie généralement sur des structures métalliques nécessitant un revêtement de surface afin de permettre la complexation des ARN interférents chargés négativement (Figure 31). Les noyaux de ces particules peuvent être construits à partir de fer magnétique, de cobalt, d'argent ou de nickel et subir des traitements de surface afin de leur imposer des fonctions chimiques (amine, carboxyl, alkyne...). Un siARN peut être associé directement à ce cœur solide par conjugaison à l'aide de ponts disulfure ou de liaisons biotine-streptavidine ^{173,174}. Dans ce second cas, les acides nucléiques biotinylés se lient de façon non covalente aux molécules de streptavidine qui recouvrent la surface des particules. De manière plus fréquente, des polymères (Dextran, Chitosan, PEG, PEI) greffés en surface des particules inorganiques favorisent la liaison des siARN ¹⁷⁵.

Revêtements polymériques



Types de polymère

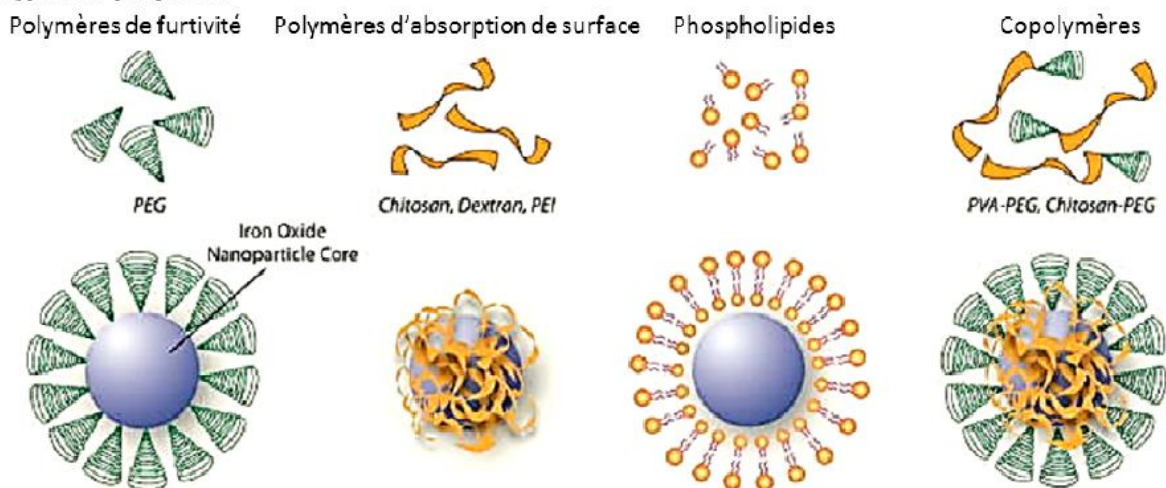


Figure 31 : revêtement de surface des particules inorganiques ¹⁷⁶.

L'avantage majeur des vecteurs inorganiques provient de leurs propriétés magnétiques autorisant la visualisation de leur distribution par IRM (*Imagerie par Résonnance Magnétique*) ou leur manipulation pour le ciblage spécifique de certains tissus, par exemple les tissus tumoraux ¹⁷⁵.

Par ailleurs, un grand nombre d'études s'appuie sur l'utilisation de quantum dots (QD), des nano-cristaux de matériaux semi-conducteurs de faibles dimensions ¹⁷⁷. Le couplage des QD avec d'autres molécules existantes habituellement utilisées en transfection peut permettre d'optimiser leur solubilité (grâce à la présence de phospholipides ¹⁷⁸), leur internalisation (grâce à des peptides de type PPC ¹⁷⁹) ou leur échappement endosomal (grâce à des polymères ou des lipides adaptés ¹⁷⁹⁻¹⁸¹).

Ainsi, une étude de Qi *et al.* démontre l'efficacité des QD, greffés avec des polymères de type PEI, pour la transfection de siARN dans le but d'inhiber JAM-2, une protéine d'adhésion surexprimée dans les gliomes ¹⁸². L'utilisation d'une concentration de 7,5 nM de ces QD modifiés, associés à une concentration de 15 nM

en siARN, permet une inhibition à 89 % de l'ARNm de JAM-2 sur des cellules de gliomes U251, attestant d'une efficacité élevée de ce vecteur ¹⁸².

En dépit d'une certaine efficacité rapportée, ce type de vecteur ne représente pas actuellement une alternative d'intérêt aux vecteurs organiques, dont l'efficacité est mieux documentée. En effet, les vecteurs inorganiques restent peu adaptés aux applications *in vivo*, puisqu'ils sont mal métabolisés et excrétés par le corps ¹⁸³. En outre, le grand rapport surface-volume et l'énergie de surface élevée de ces particules tendent à provoquer l'agrégation de celles-ci. De plus, les NP d'oxyde de fer nues ont une activité chimique élevée et sont facilement oxydées dans l'air (surtout la magnétite), se traduisant généralement par une perte de magnétisme et une dispersion ⁴⁹.

2.4.3.2. Les vecteurs organiques

2.4.3.2.1. Les vecteurs de nature polymérique

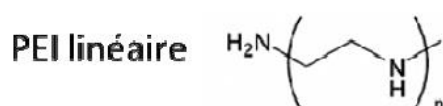
Les NP polymériques sont des systèmes colloïdaux solides, qui ont largement été étudiés pour le transport d'acides nucléiques, notamment pour les siARN (Figure 29). La grande majorité des stratégies consiste à employer des polymères pouvant se complexer aux acides nucléiques et former ainsi des polyplexes. Ils sont généralement classés en trois catégories :

- Les polymères synthétiques cationiques parmi lesquels on retrouve la polyéthylène-imine (*PEI*) et les dendrimères ;
- Les polymères synthétiques non-cationiques tels que le poly(d,l-lactide-co-glycolide) (ou *PLGA*) et les poly-conjugués dynamiques ;
- Les polymères naturels avec notamment les cyclodextrines et le chitosane ⁴⁹.

Les polymères synthétiques cationiques

Les PEI font partie des polymères synthétiques les plus connus et les plus utilisés pour la transfection de siARN. Les PEI sont formés à partir d'un réseau hautement ramifié d'éthylène-imines contenant une forte proportion de charges cationiques. L'enchevêtrement des polymères forme un réseau matriciel nanosphérique dans

lequel les siARN s'insèrent par liaisons électrostatiques (Figure 32). Les études utilisant le PEI comme constituant des vecteurs de siARN montrent des transfections très efficaces avec une endocytose favorisée *in vitro* et *in vivo* ^{184,185}. Comme de nombreux vecteurs polymériques, les PEI ont la particularité, grâce à leurs nombreuses charges positives, de déclencher l'effet « pompe à proton » et donc de favoriser l'échappement endosomal.



PEI ramifié

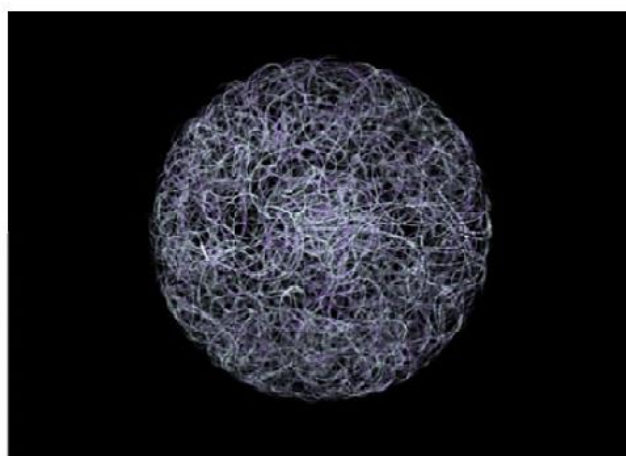
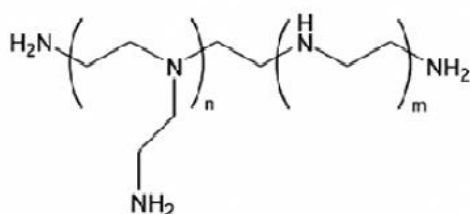


Figure 32 : formules du PEI et nanosphères de PEI ; les PEI s'organisent en « pelote » formant une sphère où peuvent venir s'insérer les siARN ⁴⁹.

En outre, un phénomène supplémentaire, l'effet « parapluie » (Figure 33), va se rajouter à l'effet « pompe à proton », permettant de rompre les membranes de l'endosome. Alors que l'effet « pompe à proton » provoque dans un premier temps l'acidification de la vésicule, les groupements amines du polymère, une fois protonés, vont dans un second temps électrostatiquement se repousser les uns des autres. C'est ce second mécanisme qui est appelé effet « parapluie ». L'acidification du compartiment endosomal entraîne ainsi une décondensation du polymère, gonflant la vésicule. Le volume occupé élargi contribue, en complément de l'entrée d'eau, à la rupture de la vésicule endosomale ⁴⁹.

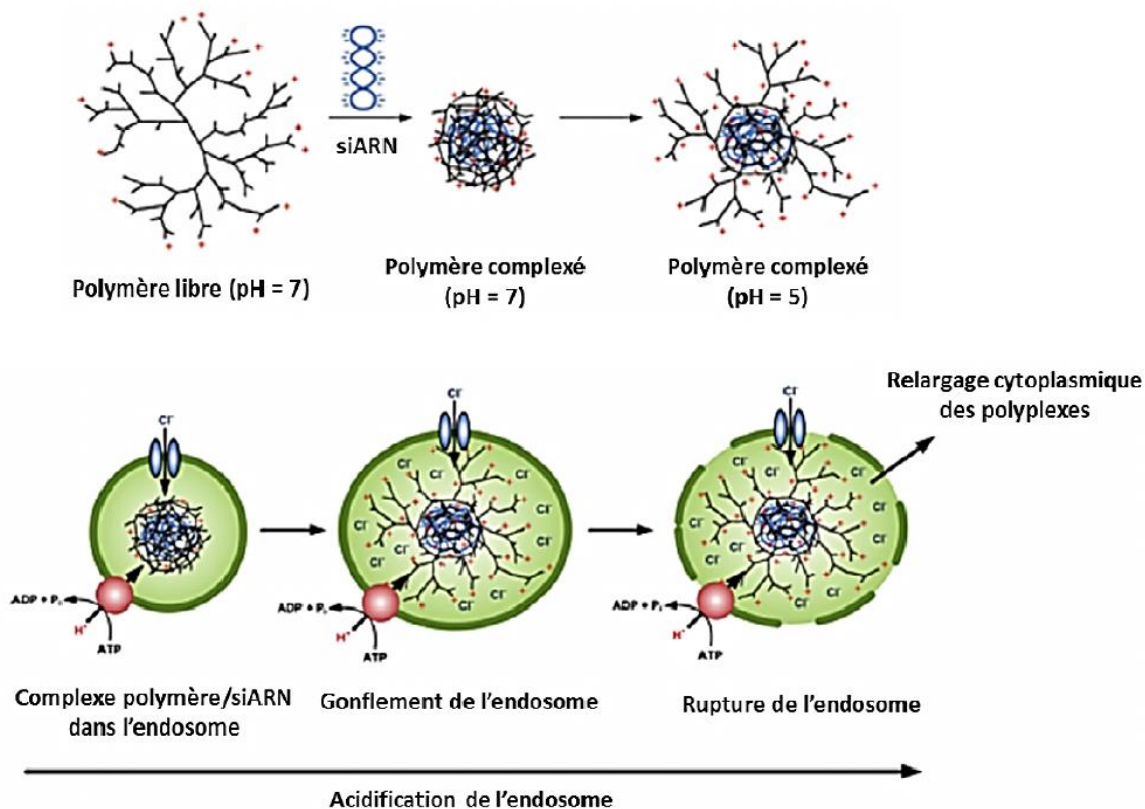


Figure 33 : représentation de l'effet « parapluie » induit par l'étalement du polymère ¹⁸⁶.

En plus de l'effet « pompe à proton », les polymères de PEI protègent les siARN, notamment des nucléases, augmentant leur temps de demi-vie ¹⁷⁹. Ainsi, Urban *et al.* ont délivré *in vivo* des siARN ciblant l'expression du gène HER-2. HER-2 est une protéine surexprimée dans de nombreux cancers humains et généralement associée à un pronostic défavorable et à un comportement malin plus agressif des tumeurs ¹⁷⁹. L'injection intra-péritonéale, deux à trois fois par semaine, de 0,6 nmole de siARN complexés au vecteur PEI permet une réduction majeure de la taille de la xénogreffe tumorale. En effet, alors que le contrôle démontre des tailles de tumeur allant jusqu'à 130 mm², l'inhibition induite par la délivrance du siARN complexé au PEI maintient la taille à 30 mm².

Cependant, le PEI entraîne aussi des effets toxiques limitant leur utilisation *in vitro* et *in vivo*. En effet, le PEI induirait la formation de canaux dans la membrane mitochondriale externe déclenchant le mécanisme d'apoptose ^{187,188}. L'induction

d'une cytotoxicité élevée a ainsi été rapportée sur des cellules d'hépatocyte THLE-3 et des cellules primaires HUVEC ¹⁸⁷.

Les dendrimères représentent une seconde famille de polymères synthétiques cationiques régulièrement décrite dans la littérature. Ces particules sont des polymères hautement ramifiés centrés autour de cavités centrales d'environ 100 nm pouvant accueillir diverses molécules hydrophiles, et en particulier des siARN, les protégeant ainsi contre la dégradation dans le sérum ¹⁸⁹ (Figure 34). Compte tenu de la grande densité de charges positives à leur surface, les dendrimères peuvent également transporter les siARN en créant des liaisons électrostatiques ^{190,191}. Les dendrimères cationiques telle que la poly-amidoamine (ou *PAMAM*) sont les plus étudiés pour la délivrance de siARN en raison de leur facilité de synthèse et de leur disponibilité commerciale. Différentes études ont montré leur efficacité pour induire l'ARNi grâce à une transfection efficace des siARN ^{192,193}. Ainsi, l'utilisation de PAMAM, modifiée chimiquement pour cibler spécifiquement les cellules A2780, dans la délivrance de siARN, a permis l'inhibition à 60 % de l'expression de la protéine BCL2 ¹⁹³. Cependant, dans cette étude de Patil *et al.*, les siARN sont utilisés à une concentration élevée de 1 μ M, démontrant la nécessité d'améliorer ces formulations pour tester des concentrations en siARN plus faibles ¹⁹³.

Cependant, comme le PEI, le polymère PAMAM présente des risques de cytotoxicité principalement dus à ses charges de surface, provoquant l'apoptose cellulaire par dysfonctionnement mitochondrial ¹⁹². Ainsi, en dépit d'une efficacité décrite pour la transfection de siARN, les polymères synthétiques semblent engendrer des risques de cytotoxicité limitant leur utilisation. Des stratégies visant à améliorer la viabilité cellulaire sont nécessaires ^{193,194}.

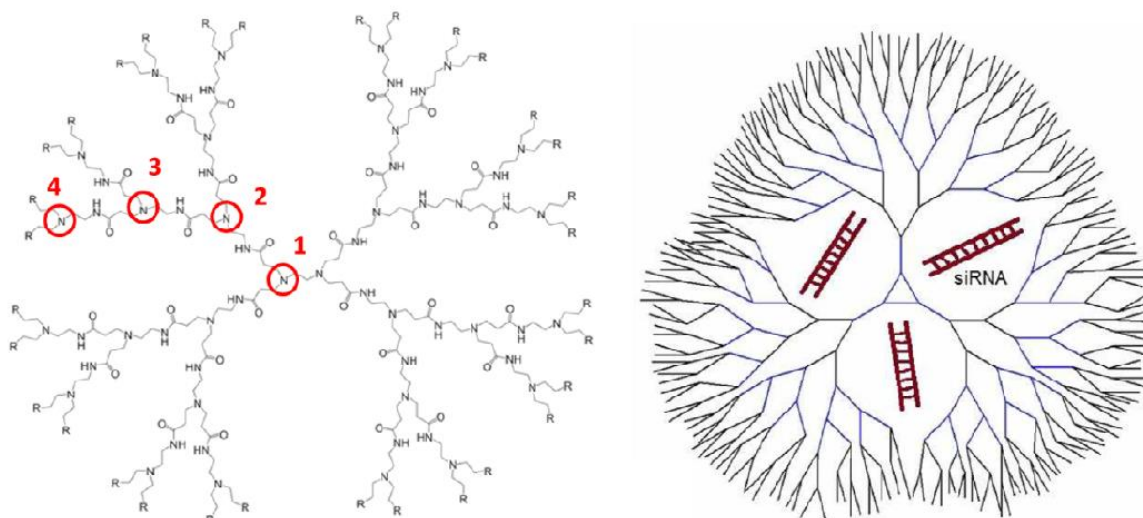


Figure 34 : structure d'un dendrimère de type PAMAM : les ramifications, numérotées de 1 à 4, renferment des cavités hydrophiles où des siARN peuvent être encapsulés ⁴⁹.

Les polymères synthétiques non-cationiques

D'autres travaux s'appuient sur l'utilisation de polymères synthétiques ayant la particularité d'être non-chargés positivement. Parmi ces polymères, on peut notamment citer le PLGA et les poly-conjugués dynamiques (polymères amphiphiles, PEG...). Le PLGA (*poly(lactic-co-glycolic acid)*) est un copolymère biodégradable d'acide glycolique et d'acide lactique (Figure 35). Ce polymère, qui participe à la formation des vecteurs, a surtout été utilisé pour la délivrance d'ADN plasmidique et de siARN ces dernières années. Par la technique d'évaporation de solvant à double émulsion, le PLGA peut se mélanger aux siARN et former des nanosphères. Une partie des acides nucléiques se retrouve protégée à l'intérieur des particules de PLGA et peut ainsi être libérée de manière prolongée. Les acides nucléiques non encapsulés se retrouvent localisés en surface des nanosphères et connaissent une libération rapide par un phénomène cinétique appelé « *burst effect* ». Le PLGA démontre plusieurs avantages majeurs pour la transfection d'acides nucléiques, à savoir une grande stabilité, une absorption cellulaire facilitée par endocytose, une bonne capacité pour cibler des tissus ou des organes spécifiques par adsorption ou liaison à un ligand, une biodégradabilité, ainsi qu'une faible toxicité ¹⁹⁰.

Cependant, ce copolymère non-cationique présente une interaction électrostatique faible avec les siARN et est moins efficace dans l'échappement endosomal et la libération de ceux-ci ^{190,195}. Pour pallier à ce problème, la complémentarité avec d'autres groupements peut être envisagée, notamment avec des molécules portant des charges cationiques tels que le DOTAP (*1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane*), le PEI ou les polyamines ¹⁸⁵. Jeon *et al.* ont ainsi associé des particules PLGA avec des polymères PEI pour l'inhibition du gène Cbfa-1 chez des cellules hMSC ¹⁹⁶. Dans cette étude, les NP-PLGA, après leur formulation, ont dans un premier temps été recouvertes par le PEI, puis dans un second temps par les siARN ciblant Cbfa-1. Les siARN se sont complexés au PEI en surface des NP-PLGA et n'ont donc pas été encapsulés dans les particules. Une inhibition majeure de l'ARNm de Cbfa-1 a été observée 24 heures après incubation du complexe polymérique ¹⁹⁶.

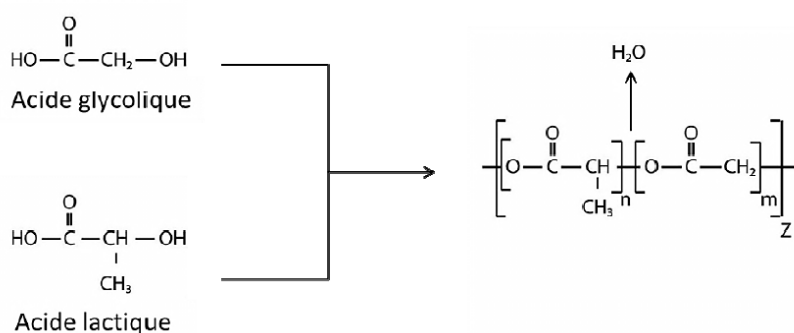


Figure 35 : structure chimique du PLGA ⁴⁹.

Les poly-conjugués dynamiques sont aussi des polymères synthétiques non-cationiques qui permettent la formation de vecteurs. Ces polymères sont un mélange de différentes molécules apportant chacune une spécificité particulière aux particules formulées ¹⁹⁷ : des polymères amphiphiles, des groupements de l'anhydride maléique, des polymères PEG et des ligands de ciblage. Les polymères amphiphiles, qui comprennent des groupements amines, favorisent l'échappement endosomal des vecteurs tandis que les polymères PEG assurent la furtivité des particules et la protection des ARN interférents. Les poly-conjugués dynamiques sont reliés entre eux par les groupements de l'anhydride maléique. Après reconnaissance spécifique des ligands par les récepteurs de la cellule cible, les vecteurs sont internalisés par endocytose. La différenciation lysosomale qui entraîne une diminution du pH et une

acidification de l'environnement (cf première partie, section IV) provoque alors la rupture des liaisons aux groupements de l'anhydride maléique. Les différentes parties des particules se séparant, les groupements amines sont découverts et permettent la lyse de l'endosome et la libération des siARN dans le cytoplasme (Figure 36) ¹⁹⁷. Néanmoins, la synthèse de ce type de particules est complexe en raison du besoin d'obtenir et d'associer de nombreux composés dans leur formulation. Ce procédé est donc coûteux par rapport à d'autres techniques usitées, par exemple pour la production de certains vecteurs disponibles dans le commerce.

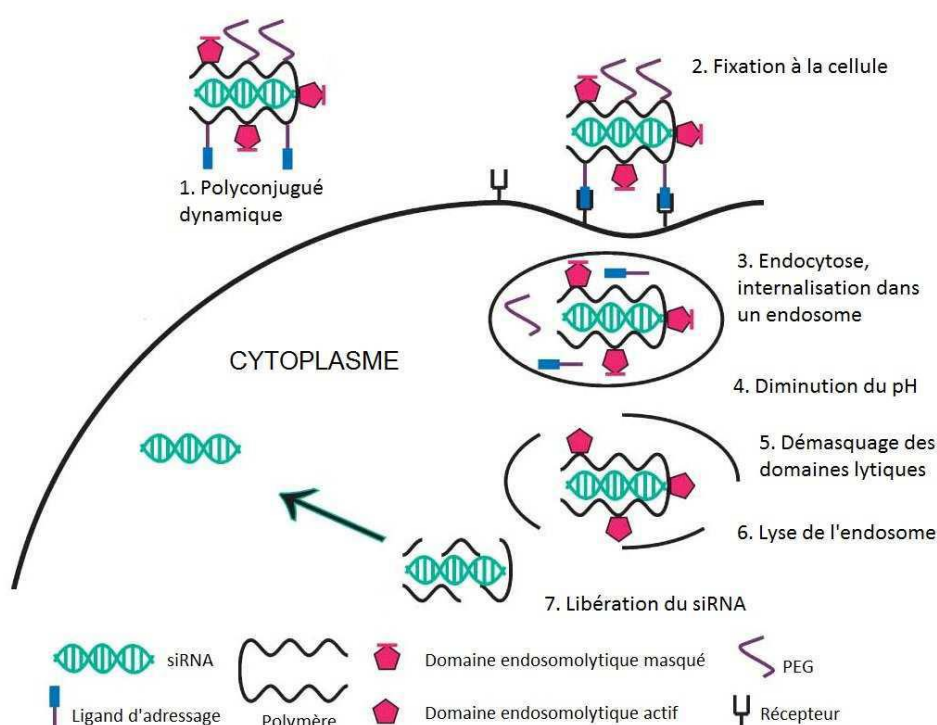


Figure 36 : fonctionnement des poly-conjugués dynamiques : la NP se désassemble de manière séquentielle et contrôlée en fonction des propriétés chimiques de l'environnement, libérant au final le siARN dans le cytoplasme ⁴⁹.

Les polymères naturels

Une alternative à la cytotoxicité importante induite par les polymères synthétiques est potentiellement possible grâce à l'utilisation des polymères naturels. Dans la littérature, la cyclodextrine, et surtout, le chitosane, sont principalement décrits pour la délivrance des siARN ⁴⁹.

Les cyclodextrines sont des polymères naturels et non-cationiques générés au cours de la digestion de la cellulose bactérienne. Elles se présentent sous la forme de structures en « tube creux » (Figure 37) de par l'existence d'une cavité en leur centre mesurant de 0,45 à 0,85 nm de diamètre. Cette cavité possède un environnement carboné hydrophobe tandis que l'extérieur du « tube » présente des groupements hydroxyles autorisant une grande solubilité en milieu aqueux. Dans cette cavité apolaire se forment des complexes d'inclusion *via* une grande variété de molécules hydrophobes. De plus, chaque molécule de cyclodextrine peut contenir du PEG lié de manière covalente permettant d'assurer la stabilité de la particule ¹⁹⁸. Malgré ses caractéristiques structurales intéressantes, ce polymère a une interaction limitée avec les acides nucléiques et nécessite donc une association avec un autre motif cationique.

Des études décrivent d'ailleurs l'utilisation de polymères polycationiques contenant aussi de la cyclodextrine, des molécules PEG, ainsi que de la transferrine utilisée comme ligand de ciblage pour la liaison aux récepteurs surexprimés sur les cellules cancéreuses ¹⁹⁹.

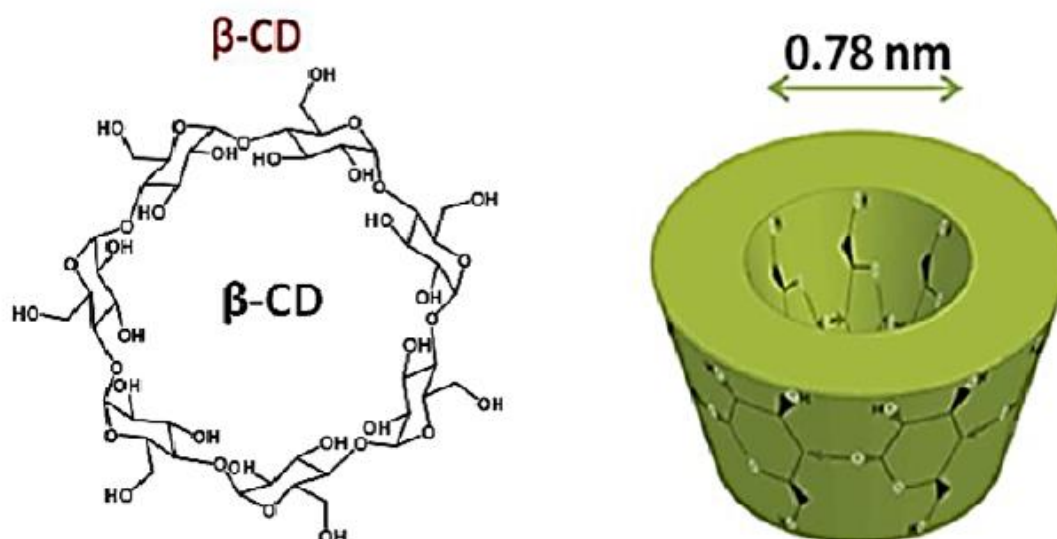


Figure 37 : schéma de la structure de la cyclodextrine beta ⁴⁹.

Ainsi, une inhibition du gène EWS-FLI1 sur des cellules TC71 a été décrite, suite à l'internalisation des siARN encapsulés dans ces cyclodextrines modifiées ¹⁹⁹. Il a été montré qu'une incubation de 48 heures avec une concentration de 100 nmol/L de

vecteurs autorise une inhibition de 59 % du gène ciblé ¹⁹⁹. Les mêmes expériences effectuées *in vivo* sur des souris C57BL/6 n'engendrent aucune expression des enzymes hépatiques (aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase), témoignant d'une innocuité intéressante de ces vecteurs ¹⁹⁹. La cyclodextrine s'avère donc être une alternative intéressante pour la transfection de siARN, mais nécessite un couplage avec une autre molécule cationique.

Enfin, l'utilisation de chitosane est régulièrement décrite pour la transfection de séquences d'acides nucléiques *in vitro* et *in vivo* ^{200–202}. Ce polysaccharide d'origine naturelle est composé de N-acétyl-D-glucosamines et de D-glucosamines distribués de manière aléatoire dans sa structure (Figure 38). Les chitosanes sont hydrophiles et leur nature polycationique facilite leur adhérence aux membranes cellulaires. En outre, les vecteurs à base de chitosane présentent comme avantages d'être biocompatibles, biodégradables et de pouvoir être produits à faible coût. Une étude a montré que des particules formulées à partir de ce polymère ont permis l'inhibition de l'expression de la protéine de fluorescence verte GFP surexprimée dans les poumons de souris. Dans cette étude décrite par Howard *et al.* ²⁰², une concentration de 1 mg/mL de siARN, complexé au chitosane, a été administrée chaque jour à une souris de manière intranasale. Après cinq jours, le nombre de cellules épithéliales exprimant la GFP au niveau des bronchioles a été réduit de 43 %, sans toxicité cellulaire associée.

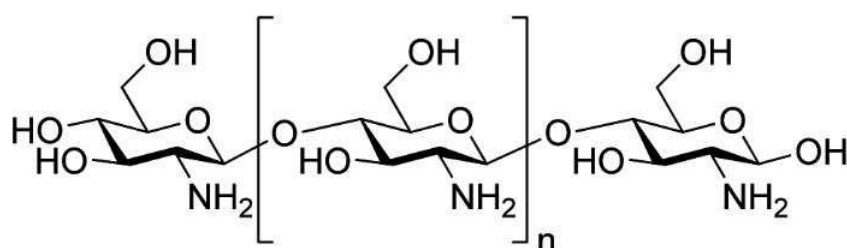


Figure 38 : structure du chitosane ; ce polymère cationique linéaire est composé d'un enchainement de glucosamine ⁴⁹.

Cependant, le chitosane permet un échappement endosomal limité dû à un pouvoir tampon parfois insuffisant pour l'endosomolyse nécessaire à la délivrance cytoplasmique ¹⁸⁵. De plus, la sélection du chitosane reste un facteur déterminant, un

poids moléculaire trop élevé de ces polymères étant couramment associé à une cytotoxicité ¹⁸⁶.

Ainsi, les vecteurs polymériques naturels autorisent une transfection de siARN efficace tout en maintenant une innocuité importante. Néanmoins, l'obtention de lots reproductibles reste difficile, en raison de certaines variabilités au niveau des étapes de caractérisation, mais aussi au niveau des résultats ⁴⁹.

En résumé, les vecteurs polymériques peuvent être séparés en trois classes, chacune présentant ses avantages et ses limites (Tableau 4). Les vecteurs utilisant des polymères synthétiques se montrent très efficaces pour la complexation des siARN grâce à la condensation des polymères avec les acides nucléiques. Par ailleurs, l'efficacité de transfection des siARN est régulièrement élevée, notamment grâce à un échappement endosomal facilité. En revanche, la toxicité cellulaire provoquée limite leur utilisation. Ainsi, une alternative par association avec d'autres groupements nécessite d'être développée pour faire usage de ce type de vecteurs ⁴⁹.

À l'inverse, les polymères naturels semblent globalement provoquer moins de cytotoxicité mais possèdent un pouvoir tampon en-deçà de celui nécessaire à la fuite de l'endosome. Sans cette étape, les siARN se voient majoritairement dégradés sans avoir eu l'occasion d'exercer leur action ⁴⁹.

Par ailleurs, les caractéristiques physico-chimiques du réseau matriciel formé par les polymères (PEI, chitosane...) doivent être parfaitement maîtrisées pour garantir une transfection efficace. Une taille non-définie, une structure dont peuvent s'échapper certains composants, libérant ainsi des siARN trop tôt, sont des aspects pouvant altérer l'efficacité de transfection ou provoquer des effets secondaires toxiques ⁴⁹.

Classe de polymère	Type de polymère	Avantages	Inconvénients
Polymères synthétiques	<i>PEI</i> <i>Dendrimère (PAMAM)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection - Échappement endosomal favorisé 	<ul style="list-style-type: none"> - Forte toxicité
Polymères naturels	<i>Cyclodextrine</i> <i>Chitosan</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Biodégradabilité - Absence de toxicité - Faible coût de production 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté d'avoir des lots reproductibles - Faible pouvoir tampon <i>Chitosan</i> - Faible associations aux siAR <i>Cyclodextrine</i>
Polymères non-cationiques	PLGA Poly-conjugué dynamique	<ul style="list-style-type: none"> - Faible toxicité - Internalisation facilitée 	<ul style="list-style-type: none"> - Complexité de production/ coût <i>Polyconjugué dynamique</i> - Échappement endosomal limité <i>PLGA</i>

Tableau 4 : comparaison des différentes classes de vecteurs polymériques ⁴⁹.

2.4.3.2.2. Les vecteurs de nature peptidique

Les peptides présentent un polymorphisme intéressant : ils ont une faible stabilité intrinsèque qui leur permet de modifier leur conformation pour s'adapter aux conditions externes ^{203,204}. Avec leur importante surface accessible et leur forte énergie d'interaction, les peptides peuvent se lier à une molécule plus facilement que la plupart des autres familles de molécules. De plus, ce polymorphisme leur confère la capacité à diminuer leur affinité pour la molécule transportée par la réorganisation de leur conformation tridimensionnelle, permettant un relargage facilité de la molécule d'intérêt ^{203,204}. Comme décrit précédemment (*cf 1.2.2.3. Groupements peptidiques*), les peptides peuvent être associés aux siARN par des liens covalents

^{138,205,206}. Cependant, l'établissement d'une liaison covalente entre le siARN et le peptide exige des taux de siARN mille fois plus importants que d'ordinaire afin de maintenir une inhibition efficace ²⁰⁷. La formation de complexes par l'établissement de liaisons électrostatiques entre les siARN et des peptides cationiques semble être la voie à privilégier. En ce sens, les peptides les plus couramment utilisés pour la transfection de siARN sont les peptides de pénétration cellulaire (PPC) (Figure 39).

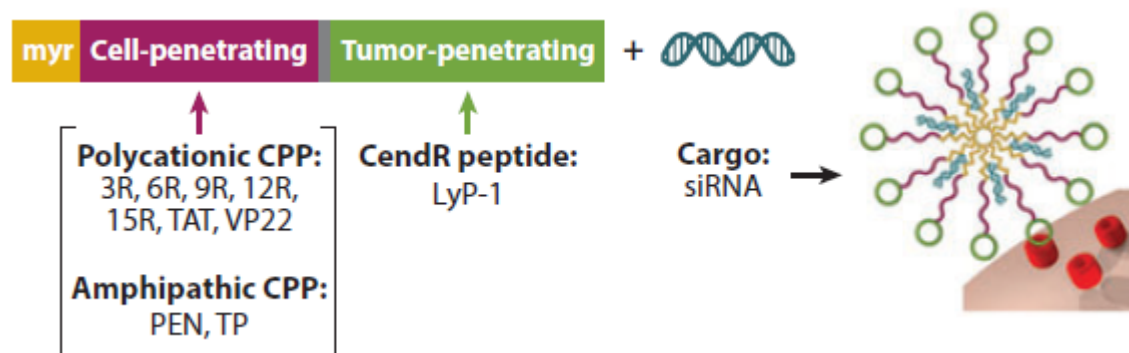


Figure 39 : pour la délivrance de siARN, conception d'une NP de ciblage tumoral à l'aide de PPC permettant d'améliorer l'absorption cellulaire et l'échappement endosomal de la NP ²⁰⁸.

Les PPC sont des petits peptides de 9 à 35 acides aminés capables d'induire la translocation d'une molécule lui étant associée à travers la membrane plasmique. Ils sont principalement constitués d'acides aminés possédant une charge cationique (arginine, lysine ou histidine), autorisant des interactions avec les siARN et les motifs anioniques présents sur la surface de la membrane plasmique ²⁰⁹. De manière générale, les peptides cationiques empruntent préférentiellement des voies dépendantes de l'endocytose (macropinocytose ou endocytose dépendante des clathrines, selon les concentrations en peptides utilisées) ²¹⁰. À l'inverse, les peptides amphipathiques pourront être internalisés par des voies indépendantes de l'endocytose.

Les PPC cationiques

Les PPC cationiques, tels que Tat ou les oligoarginines, sont riches en arginine. Ces peptides sont les plus fréquemment utilisés en raison de leur efficacité à véhiculer des molécules exogènes à l'intérieur des cellules ²¹¹. Cette efficacité accrue s'explique par la capacité de ces PPC à former des liaisons hydrogènes avec

différents groupes fonctionnels moléculaires de la cellule (phosphates, carboxylates, sulfates). Ainsi, l'affinité des PPC riches en arginine pour la surface cellulaire est augmentée ²⁰⁹. La neutralisation des charges positives de l'arginine par ces contre-ions non spécifiques entraîne la translocation des PPC à travers la membrane *via* des structures vésiculaires ²¹² (Figure 40).

Les polyarginines et Tat présentent des mécanismes respectifs assez similaires de par leur structure assez proche et la forte densité d'arginine dans leur composition. La polyarginine a déjà été utilisée dans plusieurs publications pour la transfection de siARN. Par exemple, Chol-R9, un conjugué oligo-arginine de 9 résidus, a été utilisé afin de médier l'inhibition de l'expression du VEGF ²¹³. Le VEGF est décrit comme un facteur de croissance associé à l'angiogenèse dans plusieurs maladies cancéreuses ; ainsi, une altération de son expression pourrait inhiber la croissance tumorale et le développement de métastases. L'injection intra tumorale de complexes Chol-R9/siARN ciblant VEGF, de manière répétée tous les quatre jours pendant 17 jours, a permis une diminution de la quantité de VEGF intra tumorale de 120 à 50 pg/mg de protéine. Cette réduction de 58 % a induit une diminution majeure de la vascularisation intra tumorale ²¹³. Par ailleurs, d'autres études sur un peptide chimérique composé de 9 résidus arginine, RVG-9R, ont montré *in vitro* des complexations et des transfections efficaces de siARN sur des cellules neuronales Neuro2A ²¹⁴.

De même que pour les polyarginines, le peptide Tat a déjà été utilisé avec succès dans la littérature. En effet, l'exemple de TAT-LK15 ²¹⁵, qui a permis la transfection fonctionnelle de siARN de manière aussi, voire plus efficace que des agents commerciaux, démontre le potentiel de ce genre de peptide. D'autres peptides améliorant significativement l'internalisation de siARN ont été décrits, comme par exemple la pénétratine ^{215,216}.

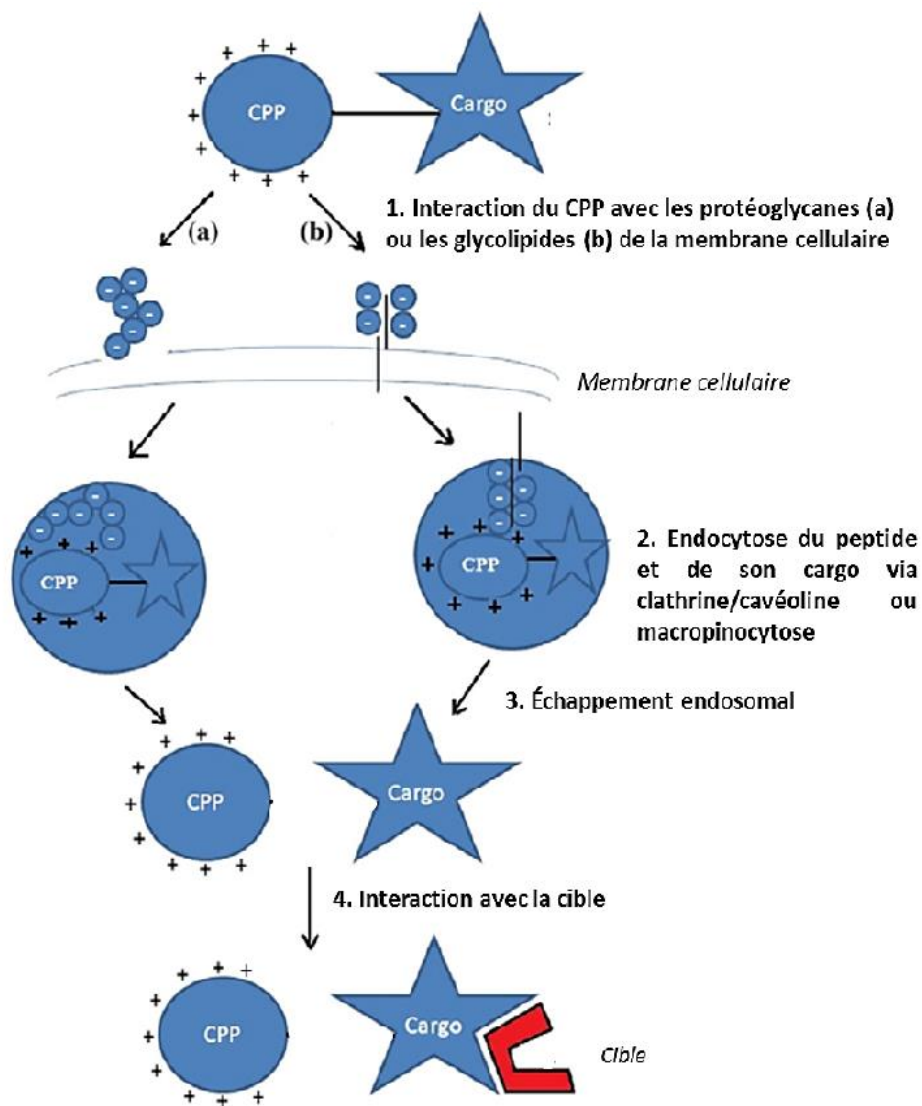


Figure 40 : mécanisme d'internalisation des peptides cationiques ; les PPC se lient de manière non-spécifique aux composants de la membrane cellulaire afin d'être internalisés par les voies d'endocytose classique ²¹⁷.

Cependant, ces peptides cationiques présentent des limites ayant trait à leur accessibilité au compartiment cytoplasmique. En effet, ces PPC possèdent une faible propension à s'échapper des vésicules endosomales ^{215,216}. Par ailleurs, les concentrations en peptides cationiques doivent être finement maîtrisées : un trop grand nombre de PPC cationiques, et donc de charges positives, peut fragiliser la membrane plasmique, voire gêner la délivrance des siARN en raison d'une rétention trop forte de ces derniers dans les vecteurs.

Les PPC amphipathiques

Les peptides amphipathiques, ou amphiphiles, sont des peptides possédant à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe. Ces peptides présentent l'avantage d'être en partie internalisés par des mécanismes indépendants de l'endocytose, *via* une perturbation temporaire de la membrane plasmique (Figure 41) ²¹⁸. Ainsi, le vecteur est directement libéré dans le compartiment cytoplasmique, sans passer par l'endosome.

Ces peptides sont caractérisés par des complexations très stables avec les molécules qu'ils transportent, notamment les siARN, et par une interaction forte avec les mono- et bicouches de phospholipides, principalement à travers des interactions électrostatiques. Par ailleurs, ils présentent un polymorphisme structural marqué : leur forme est libre en solution alors qu'ils adoptent une structure secondaire en feuillet β (c'est le cas pour le peptide amphiphile MPG) ou en hélice α (comme pour les peptides amphiphiles CADY et Pep-1) en cas d'interactions avec des phospholipides ²¹⁸.

Les étapes d'internalisation des PPC amphipathiques sont dépendantes de la tension moléculaire et suivent le modèle de Deshayes *et al.* (Figure 41) ²¹⁸ : (1) le peptide et le siARN se lient par des liaisons électrostatiques et hydrophobes, induisant un repliement partiel du peptide et formant le « noyau » du complexe ; (2) les complexes sont stabilisés par des interactions peptide/peptide, qui constituent à leur tour la périphérie de la particule ; (3) les interactions électrostatiques du complexe avec les protéoglycanes de la surface cellulaire (4) initient la liaison avec les phospholipides ; (5) Ensuite, l'insertion dans la membrane cellulaire est autorisée par l'entrée des peptides situés en périphérie du complexe, créant un « pore » temporaire ; (6) enfin, l'insertion des complexes entiers dans la membrane est conjointe à des transitions du potentiel de la membrane et de la conformation des peptides. En effet, ces transitions provoquent des perturbations dans la structure de la membrane *via* le remodelage des réseaux d'actine, permettant la libération des complexes « cœur » dans le cytoplasme.

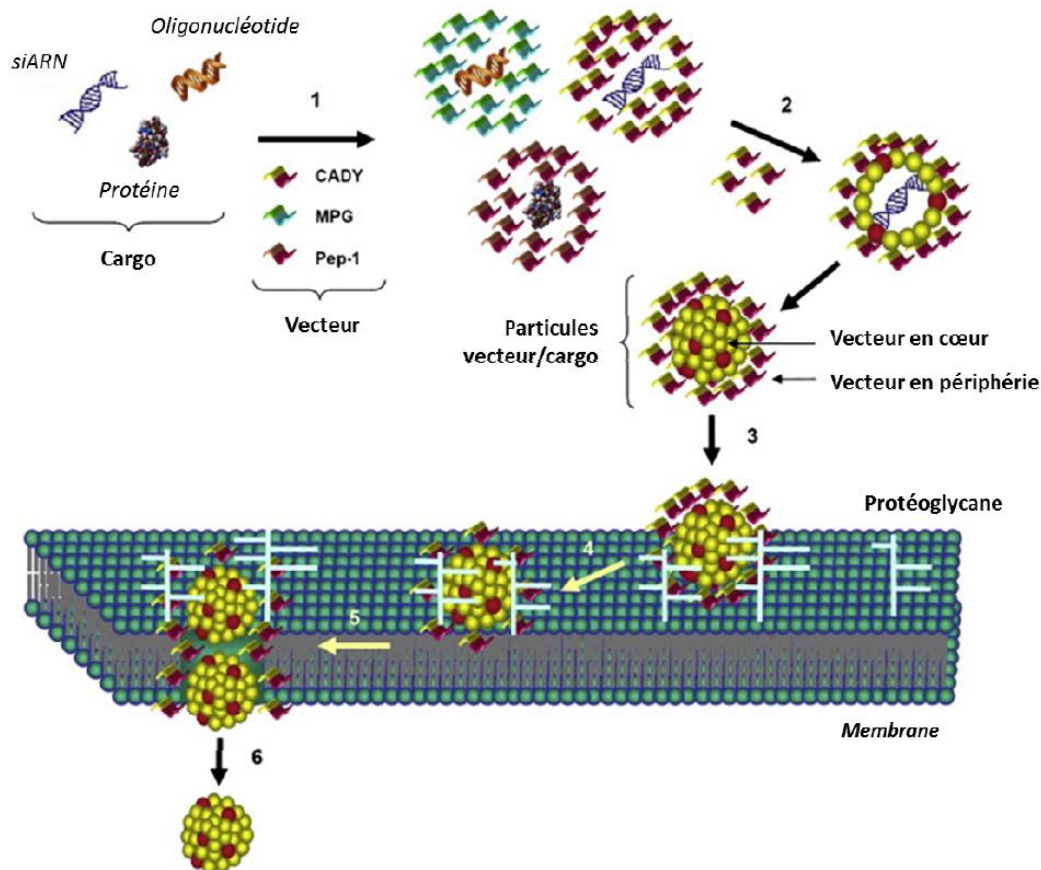


Figure 41 : mécanisme d'internalisation des peptides amphiphiles ²¹⁸.

Parmi les PPC amphiphiles, trois peptides se démarquent : MPG, CADY et Pep-1. MPG est un peptide primaire dérivé d'une séquence hydrophobe du HIV-1 et d'une séquence de localisation nucléaire hydrophile riche en lysine, issue du virus simien 40, encore appelé SV40 ²⁰⁷. La partie riche en lysine du peptide est nécessaire pour son interaction avec les acides nucléiques ainsi que pour sa solubilité, tandis que sa partie hydrophobe joue un rôle dans sa liaison avec la membrane cellulaire et son internalisation. Dans la littérature, MPG a déjà montré des résultats intéressants *ex vivo* et *in vivo* pour la délivrance de siARN, avec une amélioration de l'accessibilité intra-cytoplasmique sur une large variété de cellules cancéreuses, et sans montrer de cytotoxicité ²¹⁹. Ainsi, dans une de leurs études, Crombez *et al.* rapportent une réduction de 80 % de la protéine cible, la Cycline B1, chez des cellules Hela après 24 heures d'incubation de celles-ci avec des complexes MPG-8/siARN ²²⁰. Cependant, une concentration élevée du siARN testé (100 nM) avait été utilisée, ce qui peut expliquer en partie les résultats ayant été obtenus, et exige donc des tests

complémentaires justifiant de l'impact réel du vecteur expérimenté ²²⁰. Suite à plusieurs études, il a été constaté que la transfection des siARN avec les MPG était moins efficace qu'avec un agent commercial lipidique ²²¹. En effet, après 24 heures d'incubation sur des cellules ECV GL3, la quantité intracellulaire de siARN est 4 à 6 fois supérieure lorsque de la Lipofectamine 2000 est utilisée. En outre, la quantité de siARN biodisponible dans les cellules est environ 30 fois plus faible après transfection *via* des MPG qu'avec des lipides cationiques ²²¹. Ainsi, Veldhoen *et al.* ont démontré qu'une grande quantité de PPC amphiphiles était internalisée par les mécanismes classiques d'endocytose malgré le fait qu'une partie de ces peptides suit le modèle de Deshayes *et al.* ²²¹. Comme ces vecteurs ne possèdent pas les outils nécessaires pour leur permettre un échappement endosomal efficace contrairement aux lipides cationiques, ils subissent donc une dégradation lysosomale supérieure avant d'atteindre le compartiment cytoplasmique ²²¹.

CADY est un peptide secondaire dérivé du peptide fusogène JTS1 et capable d'adopter une conformation hélicoïdale. Sa transduction et sa stabilité sont assurées par une acétylation en position N-terminale, par l'ajout d'un groupement cystéamine en position C-terminale, ainsi que par la présence d'un groupement aromatique. En présence de lipides ou de siARN, CADY adopte une structure secondaire en hélice alpha, répartissant de manière stable les siARN le long de celle-ci ²²². Ce PPC forme des complexes stables avec les acides nucléiques grâce à l'établissement de liaisons électrostatiques. En outre, CADY permet une transfection efficace des siARN et ne montre aucune cytotoxicité aiguë ou à long terme sur les cellules transfectées, quel que soit le rapport molaire appliqué ²²³. En effet, après 24 heures d'incubation du complexe CADY/siARN sur des cellules U₂OS, une diminution majeure de la quantité d'ARNm ciblé est observée ; un ratio N/P de 40/1, pour une concentration en siARN de 20 nmol/L, permet une inhibition à 95 % de la quantité d'ARNm de GAPDH ²²³.

Quant à Pep-1, c'est un peptide primaire comprenant un domaine hydrophobe riche en tryptophane dérivé du HIV-1, et comme MPG, un domaine hydrophile dérivé du SV40. Un groupe cystéine est également présent en partie C-terminale, groupement ayant un rôle crucial dans l'internalisation du cargo. Les parties hydrophiles et hydrophobes sont reliées par des résidus proline qui permettent de garder la flexibilité et l'intégrité des deux domaines. Ce PPC, contrairement à MPG

ou CADY, est plus indiqué dans le transport de protéines/peptides et de molécules neutres ²¹⁹.

Ces peptides s'avèrent être très prometteur pour la délivrance de siARN. Cependant, le bon équilibre doit être trouvé, tenant compte à la fois de la stabilité de la particule, de la concentration en PPC utilisée et de leur capacité à interagir avec les lipides de la membrane. Des changements dans la séquence peptidique, ou l'utilisation d'une concentration trop importante de PPC amphiphiles, peuvent provoquer une agrégation des complexes et induire d'autres voies d'internalisation, notamment celles utilisant l'endocytose ^{221,224}. Les PPC amphiphiles n'étant que peu adaptés pour un échappement endosomal, la quantité de siARN biodisponible s'en retrouve affectée, diminuant malencontreusement l'efficacité de transfection.

Les vecteurs peptidiques présentent la capacité de favoriser l'internalisation des siARN dans les cellules, en empruntant préférentiellement les voies d'endocytose. Comme les PPC, de base, ne sont pas capables de produire une activité induisant l'échappement endosomal (cf première partie, section IV), la complémentarité avec une autre molécule exerçant ce rôle devient nécessaire ⁴⁹.

À l'heure actuelle, d'après plusieurs estimations et au regard des requêtes régulièrement effectuées auprès des principaux fournisseurs, environ 75 % des agents commercialisés pour la transfection des siARN sont de nature lipidique. Cette grande famille de vecteurs semble donc posséder des caractéristiques avantageuses dans cette application ⁴⁹.







	Vecteurs inorganiques		Vecteurs polymériques		Vecteurs peptidiques	
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés magnétiques <i>visualisation, manipulation</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection - Échappement endosomal <i>Polymères synthétiques</i> - Absence de toxicité <i>Polymères naturels</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Internalisation facilitée 	
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Association avec d'autres groupements nécessaire - Pas métabolisés / peu excrétés - Risques toxicologies 		<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité importante <i>Polymères synthétiques</i> - Faible pouvoir tampon / Faible échappement endosomal <i>Polymères naturels</i> - Reproductibilité des lots - Formulation utilisant des solvants 		<ul style="list-style-type: none"> - Faible échappement endosomal 	
Applications possibles		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> limitées par l'absence de métabolisation - <i>In vitro</i> limitées par la toxicité possible - HTS 		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> limitées par la toxicité - <i>In vivo</i> limitées par la toxicité - HTS limitées par le manque de contrôle 		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> limitées par l'efficacité - <i>In vivo</i> limitées par l'efficacité - HTS Limitées par l'efficacité
		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter 		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter 		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter

Tableau 5 : comparaison de trois grandes classes de vecteurs synthétiques ⁴⁹.

2.4.3.2.3. Les vecteurs de nature lipidique

A) Les liposomes neutres

Les vecteurs lipidiques représentent actuellement la famille de particules la plus présente dans le commerce. Parmi ceux-ci sont retrouvés les liposomes, utilisés comme transporteurs pour des applications biologiques et pharmaceutiques depuis de nombreuses années. Ces structures ont été parmi les premières à être étudiées, développées et mises sur le marché. Ce sont ainsi les NP les mieux caractérisées²²⁴. Les liposomes contiennent des lipides faciles à obtenir et sont parfaitement biocompatibles en raison d'une composition proche de celle des membranes cellulaires. Par ailleurs, leur fabrication est simple. La façon la plus classique de les préparer est celle dite de l'hydratation d'un film lipidique. Les liposomes se présentent sous la forme d'un auto-assemblage sphérique d'une bicouche lipidique de taille variable, avec un cœur aqueux pouvant transporter des molécules hydrophiles. Le greffage de polymères hydrophiles de type PEG, en surface des particules, permet de développer un encombrement stérique améliorant leur furtivité, et donc leur stabilité dans le système vasculaire *via* un temps de séjour prolongé (Figure 42)^{171,225}. Les liposomes sont des NP qui offrent une protection physique aux ARN interférents transportés tout en affichant une innocuité importante.

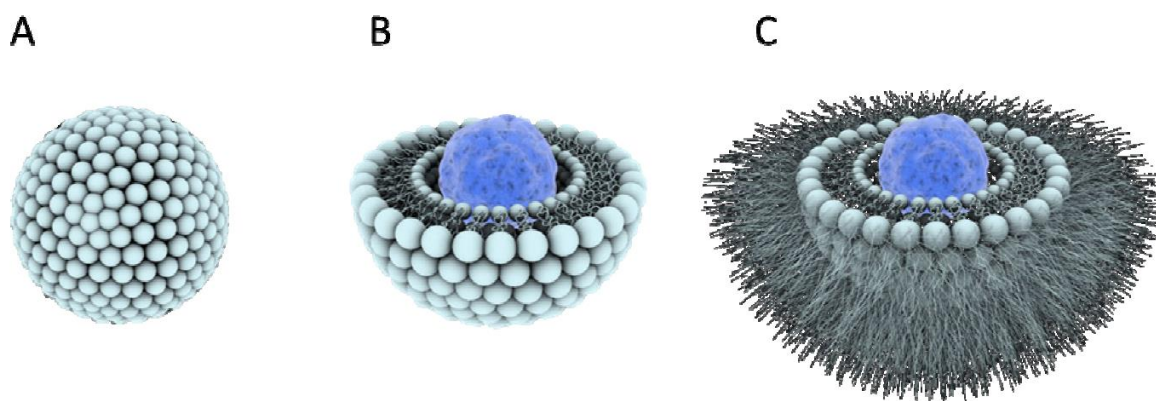


Figure 42 : représentation tridimensionnelle des liposomes ; les liposomes se présentent sous la forme d'un auto-assemblage sphérique (A) d'une bicouche lipidique délimitant un cœur hydrophile (B). Des liposomes de seconde génération ont été développés, ajoutant un revêtement de PEG (C)⁴⁹.

Les lipides testés dans les vecteurs lipidiques, qu'ils soient neutres ou cationiques, possèdent une structure commune malgré leur nature chimique différente : une tête hydrophile (cationique ou non), un espaceur et une partie hydrophobe (Figure 43). La partie hydrophobe est souvent constituée par une ou deux chaînes d'acides gras ou groupements alkyls de 12 à 18 atomes de carbone. Les acides gras les plus fréquemment utilisés sont les acides oléiques (C18), palmitoléiques (C16) et myristyliques (C14). D'autres molécules, tels que le cholestérol ou l'acide biliaire, peuvent également occuper ce rôle ⁴⁹.



Figure 43 : représentation de la structure des lipides utilisés pour former les liposomes ⁴⁹.

Dans les liposomes, les ARN interférents, de nature hydrophile, se situent dans le cœur hydrophile de la particule. Les lipides zwitterioniques, qui sont des lipides globalement neutres, peuvent apporter un pouvoir fusogène et favoriser l'échappement endosomal par « appariement ionique ». Un zwitterion est une espèce chimique moléculaire possédant des charges électriques formelles d'une unité, de signes opposés et situées en général sur des atomes non adjacents. Ainsi, le 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (*DOPE*) est un lipide neutre couramment utilisé dans la formulation des liposomes ⁴⁹.

Des systèmes à base de liposomes neutres, contenant des siARN ciblant l'expression d'un oncogène EphA2, ont été évalués sur des modèles tumorales orthoptiques de souris développant un cancer ovarien HeyA8 ou SKOV3 ^{226–228}. Ces systèmes ont ainsi pu induire une réduction du développement tumoral sur les modèles étudiés après répétition des doses ^{226–228}. Cet effet est d'ailleurs plus fort après co-délivrance avec un agent anticancéreux de type Paclitaxel ^{226–228}. Ce type de formulation a été testé lors d'essais cliniques de phase I dans le but de définir les doses maximales tolérées chez des patients exprimant des cancers à un stade

avancé. Cependant, malgré l'obtention d'effets biologiques grâce aux oligonucléotides vectorisés ^{226–230}, le rendement de transfection s'est avéré trop faible, probablement en raison d'un rendement d'encapsulation des siARN non-optimal ²²⁴.

Dans ce contexte, une optimisation des formulations est nécessaire pour augmenter la prise en charge des siARN par les liposomes. Comme décrit précédemment, l'établissement de liaisons électrostatiques, entre les charges négatives des acides nucléiques et les charges positives du vecteur, représente une solution pertinente. La formation de liposomes chargés positivement permettant d'améliorer la transfection des ARN interférents en est la parfaite illustration ⁴⁹.

B) Les liposomes cationiques

Par définition, un lipoplexe représente une complexation entre des lipides cationiques et des séquences d'acides nucléiques. L'un des critères majeurs influant sur l'obtention d'une délivrance efficace des ARN interférents concerne la maîtrise de la composition lipidique de ces vecteurs. Les études visant à identifier un lipide optimal pour ce type d'application ont permis d'améliorer grandement l'efficacité de transfection et ainsi de diminuer les doses de vecteurs utilisées ²³¹.

Vis-à-vis des lipides neutres, les lipides cationiques permettent une meilleure complexation des siARN à l'intérieur ou à l'extérieur de la sphère lipidique. De plus, les charges positives peuvent également favoriser l'interaction avec la membrane plasmique et provoquer l'échappement endosomal par « appariement ionique ». Un lipide cationique couramment utilisé dans les lipoplexes est le 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane (*DOTAP*) ; il existe néanmoins une très grande variété de lipides utilisables (Tableau 6) ⁹⁸.

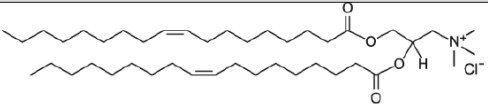
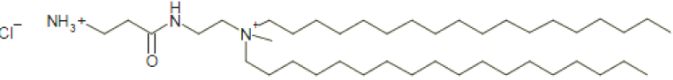
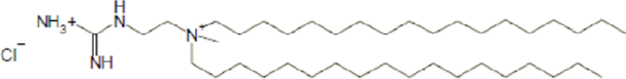
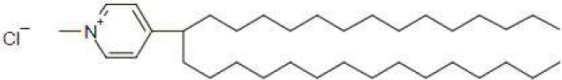
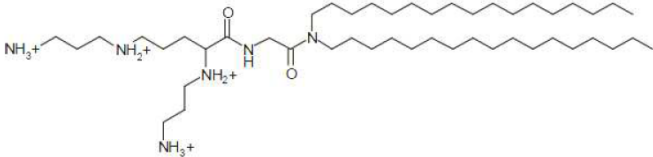
Nature de la tête	Exemple	Structure
Ammonium quaternaire	DOTAP	
Acides aminés	Alanine	
Guanidinium		
Pyridinium	SAINTs	
Polyamines	DOGS	

Tableau 6 : synthèse des différents lipides cationiques utilisés pour la formation des lipoplexes : description, exemple et structure ⁴⁹.

Les liposomes cationiques instables

Les liposomes cationiques peuvent être utilisés aussi bien *in vitro* que pour des applications *in vivo*.

Pour des applications *in vitro*, ces liposomes sont caractérisés par une certaine instabilité et les siARN se présentent à la surface des particules en se complexant aux têtes polaires cationiques ⁸⁰. Les lipoplexes formés peuvent alors interagir entre eux, créant différentes structures (Figure 44) : les siARN peuvent être intégrés entre les feuillets lipidiques (A) et/ou dans le cœur de micelles formées par le réarrangement des lipides (B). Un empilement des feuillets est possible par alternance des couches lipidiques et séquences d'acides nucléiques (A) ²³². De nombreux types de liposomes adoptant ces conformations en présence de siARN sont commercialisés et utilisés en laboratoire comme agents de transfection (Lipofectamine®, Oligofectamine®, i-Fect®...) ⁴⁹.

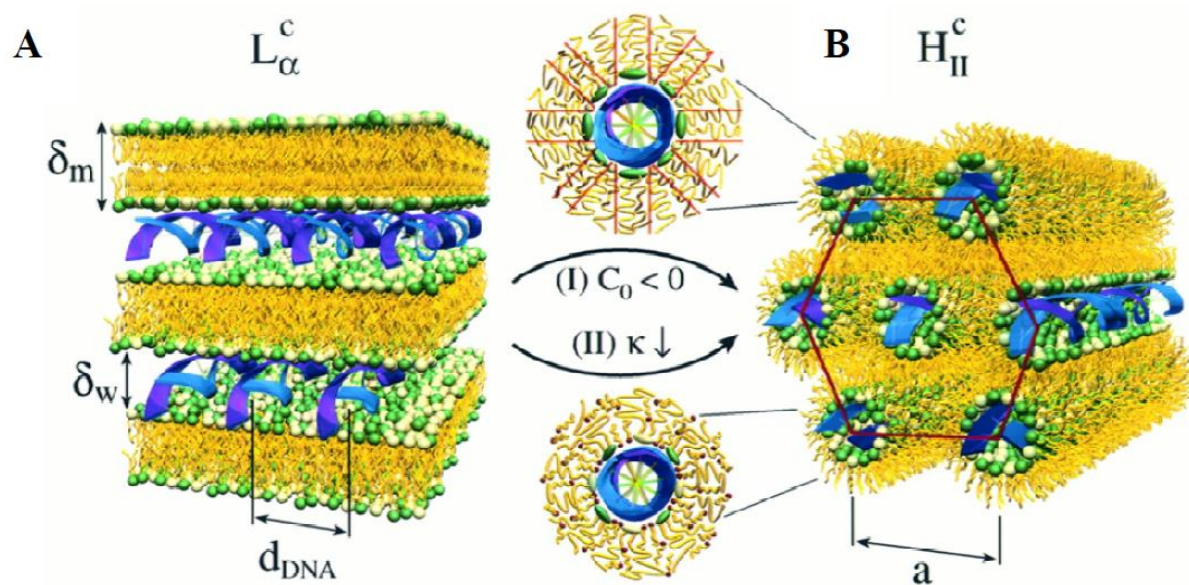


Figure 44 : schéma des lipoplexes sous forme de feuillets ; les acides nucléiques peuvent se disposer entre les feuillets de bicouches lipidiques (A) ou être au cœur de micelles inverses (B) ²³³.

Un système lipoplexe dénommé AtuPlex[®] et conçu par Silence Therapeutic (Londres, Royaume-Uni) a été testé dans plusieurs essais cliniques. Ce lipoplexe comprend notamment un lipide poly-cationique, AtuFect1, associé à du DOPE et à un lipide PEGylé (DSPE-PEG) ^{84,234}. Le système AtuPlex[®] présente *in vitro* une efficacité d'inhibition fonctionnelle élevée sur des gènes exprimés spécifiquement par l'endothélium, tels que CD31 et Tie2. Une répression des ARNm et des protéines correspondantes a ainsi été constatée. De plus, lors d'études *in vivo* sur des souris, une délivrance rapide de siARN a été rapportée grâce à ce système et qui se produisait essentiellement dans certains organes (foie, rate, poumons, cœur, pancréas et reins) ⁸⁴. Ensuite, ce même laboratoire a développé un autre lipoplexe, Atu027, dont les tests sur des souris porteuses de tumeurs pancréatiques ou prostatiques orthoptiques ont démontré une inhibition de la croissance tumorale, après injections répétées de siARN ²³⁵. Toutefois, bien que la formation de métastases était contrecarrée par cette méthode, l'injection répétée ne diminuait pas le volume de la tumeur primaire ²³⁵. En outre, des tests cliniques de phase I ont rapporté que la dose maximale tolérée de siARN chez des patients humains était de

seulement 0,336 mg/kg ²³⁶, attestant d'une certaine toxicité des fortes doses et d'une limitation des concentrations pouvant être utilisées.

Afin de rationaliser les formulations lipidiques, une banque de plus de 1200 molécules lipidiques a été élaborée par l'équipe de Langer et Anderson au MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) ²³⁷. Ce travail a permis de mettre en évidence une nouvelle famille de molécules apparentées aux lipides : les lipidoïdes (Figure 45). Ils sont synthétisés par additions successives d'alkylacrylates et d'alkyl-amides à longues chaînes carbonées sur des amines primaires ou secondaires. Pour se différencier des lipides cationiques ionisables, les lipidoïdes possèdent un excès de charge positive dû aux multiples groupements amine pouvant être protonés ⁴⁹.

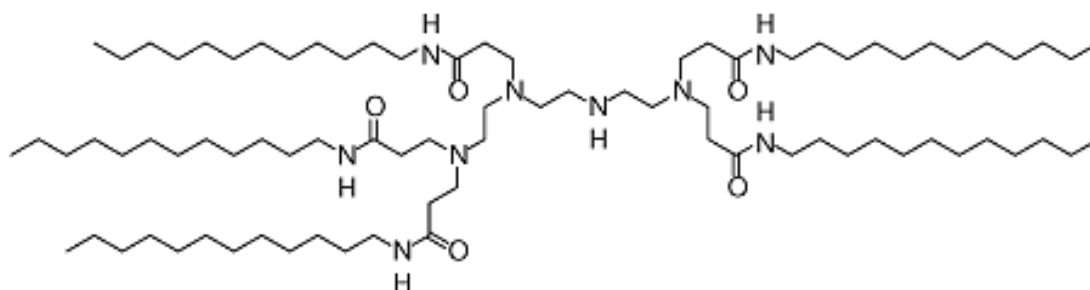


Figure 45 : exemple d'un lipidoïde, le 98N12-5(1) ; il comprend cinq chaînes d'alkyl-acrylamide à 12 carbones attachées à un noyau amine ⁴⁹.

Les lipoplexes utilisent les lipidoïdes sous la forme d'agglomérats de ceux-ci, conjugués aux ARN interférents. Ces préparations ont permis d'induire une extinction efficace et persistante de différentes cibles hépatiques et pulmonaires, à la fois chez la souris, le rat et le singe ^{237,238}. En effet, Frank *et al.* ont utilisé des doses de 5 mg/kg de lipidoïdes pour transfecter des siARN chez des primates non-humains et inhiber l'expression de PCSK9, une protéine impliquée dans une forme héréditaire dominante de l'hypercholestérolémie ²³⁸. Ainsi, les niveaux plasmatiques de PCSK9 ont été diminués de 86 %, démontrant la forte efficacité de ces vecteurs ²³⁸.

Cependant, ce type de lipoplexes est souvent privilégié pour des applications *in vitro*. En effet, dans ces applications, une protection optimisée offerte par l'encapsulation des siARN n'est pas nécessaire. Une simple complexation post-formulation est suffisante pour permettre la transfection d'ARN interférents. A

contrario, *in vivo*, ces lipoplexes peuvent s'associer aux protéines sériques *via* leurs charges cationiques et ainsi entraîner leur clairance rapide, voire une toxicité systémique importante. Par ailleurs, les complexations peuvent être instables et de tailles excessives ²³⁹. Cette faible stabilité rend les siARN vulnérables lors d'applications *in vivo*, et peut induire des variabilités au niveau de l'efficacité de transfection ²³⁹.

Les liposomes cationiques stabilisés : les SNALP

Felgner *et al.* ont été les premiers à démontrer l'utilité des lipides cationiques pour la transfection de séquences d'acides aminés *in vitro* ²⁴⁰. Cependant, les applications *in vivo* utilisant ces lipoplexes sont fortement limitées en raison de leur toxicité qui peut être systémique et cellulaire, mais aussi à cause de leur clairance rapide. En effet, le temps de circulation dans le système vasculaire peut être court, par exemple en cas d'absence de greffage de PEG sur les liposomes. Ce faible temps de circulation est la conséquence des nombreuses charges cationiques et de la taille importante (> 200 nm) de ces vecteurs. Ainsi, pour les applications *in vivo*, des liposomes cationiques plus stables et de taille mieux contrôlée ont été développés, assurant une rétention plus élevée des siARN : les SNALP (*Stable Nucleic Acid Lipid Particle*) (Figure 46) ²⁴⁰. Ces particules se présentent sous la forme de bicouches lipidiques composées de plusieurs lipides (cationiques, fusogènes...), ainsi que par le greffage en surface de polymères PEG, favorisant la furtivité des SNALP.

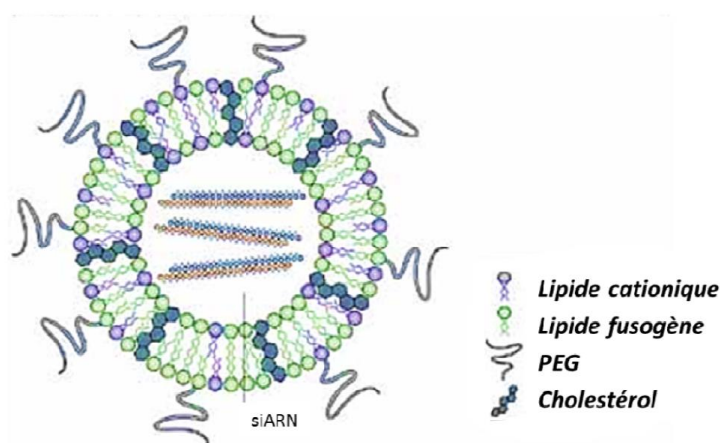


Figure 46 : représentation d'une particule lipidique de type SNALP ; les charges cationiques sur la surface interne du liposome autorisent une complexation stable avec les siARN ⁴⁹.

Au cours de la formulation et au niveau de la surface interne des liposomes, les siARN se complexent aux charges positives des lipides cationiques de la bicouche lipidique ce qui permet une protection élevée des séquences d'acides nucléiques. En outre, l'utilisation de lipides fusogènes ionisables peut s'avérer être un atout : en effet, l'incubation dans un tampon acide permet à ces liposomes d'exprimer des charges positives lors de leur internalisation dans les vésicules endosomales, facilitant l'échappement endosomal par « appariement ionique ». De plus, leur toxicité s'en retrouve diminuée et leur temps de circulation dans l'organisme augmenté grâce au greffage en surface des polymères PEG qui limitent l'association des SNALP aux protéines sériques. Par ailleurs, les SNALP ont la particularité d'être internalisés par endocytose sans activation des récepteurs TLR, empêchant ainsi la stimulation du système immunitaire ²⁴¹.

L'un des résultats les plus représentatifs de l'efficacité des SNALP est démontré dans les travaux de Zimmerman *et al.* qui rapportent la première induction du mécanisme d'ARNi chez des primates non humains ²⁴². 48 heures après l'injection en IV de 1 à 2,5 mg/kg de SNALP encapsulant des siARN, une réduction de 90 % de l'apolipoprotéine B a été mesurée ²⁴². De plus, une seule injection de 2,5 mg/kg a permis d'observer cet effet jusqu'à 11 jours après traitement ²⁴².

En 2014, cinq essais cliniques promus par Alnylam et Tekmira étaient entrepris grâce à cette technologie. L'un d'entre eux est déjà en phase III et un autre en phase II. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la transthyréine (*TTR*) était évaluée à 50 % pendant 28 jours après injection de doses de 1 mg/kg et 0,15 à 0,5 mg/kg, respectivement pour les essais ALNTTR01 et ALNTTR02 ²⁴³. Cependant, même si une efficacité de transfection importante des siARN a été rapportée, l'utilisation de ce type de particules est limitée principalement à des applications *in vivo*, où seulement quelques siARN déjà bien caractérisés sont expérimentés. L'encapsulation des siARN ne pouvant s'effectuer que durant la formulation des NP de SNALP, celles-ci nécessitent donc d'être produites expressément pour chaque siARN testé. Ainsi, un travail considérable et fastidieux est exigé pour des expériences *in vitro* contrôlant un grand nombre de siARN différents ²⁴⁴.

C) Les nanoparticules lipidiques cationiques

Avec les particules ciblant les applications *in vitro* (liposomes instables) et celles destinées aux applications *in vivo* (SNALP), une autre classe de vecteurs lipidiques se plaçant entre ces deux catégories a été développée. Longtemps utilisées pour d'autres applications, les nanoparticules lipidiques cationiques (NPLc) se présentent comme une solution multifonctionnelle pour la délivrance d'ARN interférants. Ces particules sont formées d'une monocouche de lipides dont les chaînes carbonées sont orientées vers un cœur lipidique hydrophobe. Ce cœur permet l'encapsulation de diverses molécules lipophiles (médicaments, fluorophores...) pour de multiples applications (imagerie de fluorescence, délivrance de médicaments liposolubles...). Les charges cationiques présentes en surface permettent par exemple la complexation des siARN hors du cœur lipidique hydrophobe (Figure 47). Cette stratégie rend réalisable l'étude de nombreux siARN car, à l'image des vecteurs lipidiques instables, de simples interactions électrostatiques post-formulation des siARN avec la particule sont nécessaires, un avantage comparé aux particules de type SNALP. En effet, une étude sur des milliers de siARN différents peut alors être effectuée avec une même formulation de NPLc. Ainsi, de nombreux résultats pour la délivrance de siARN s'appuyant sur cette technologie ont été rapportés dans la littérature ²⁴⁵⁻²⁴⁷.

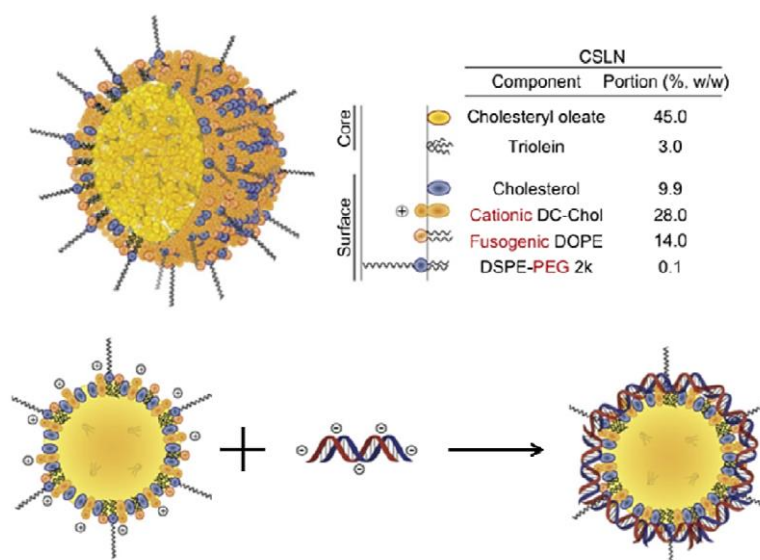


Figure 47 : schéma d'une nanoparticule lipidique cationique (NPLc) et de sa complexation avec les siARN ²⁴⁵.

En ce sens, Kong *et al.* ont démontré une internalisation facilitée des siARN sur des cellules HepG2 : jusqu'à 88 % des cellules sont décrites comme positives pour l'internalisation de siARN après transfection par des NPLc d'environ 100 nm ²⁴⁵. Dans le même temps, le contrôle qui utilisait un lipoplexe commercial, la Lipofectamine, n'affichait une internalisation des siARN que dans 48 % des cellules traitées ²⁴⁵. En revanche, l'efficacité d'inhibition induite par cette transfection montre des limites. Alors qu'avec une concentration en siARN de 5 nM, le vecteur de type PEI 25 kDa permet une inhibition de 40 % du gène ciblé (codant pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B), l'utilisation de NPLc nécessite des concentrations en siARN de 100 nM pour obtenir un résultat d'inhibition équivalent ²⁴⁵. Néanmoins, en dépit de cette efficacité d'inhibition moins importante, un avantage reconnu à ce vecteur reste celui de son importante innocuité : une concentration en NPLc de 80 µg/mL permet une viabilité supérieure à 90 % alors qu'avec le PEI, la mortalité cellulaire est totale dès une concentration de 20 µg/mL ²⁴⁵.

Une autre étude utilisant des NPLc similaires a décrit la vectorisation combinée d'un siARN et d'un agent anti-tumoral, le paclitaxel ²⁴⁷. Yu *et al.* ont démontré que trois injections sur quatre jours de 0,17 mg/kg de siARN, ciblant la protéine MCL1 chez des souris BALB/C, permettaient de diminuer le volume d'une xénogreffe de tumeur d'environ 50 %. De plus, l'inhibition de MCL1 augmente la sensibilité des cellules cancéreuses aux médicaments chimiothérapeutiques ; ainsi, la vectorisation de ce siARN combiné au paclitaxel a, au final, diminué le volume de la tumeur de 1390 mm³ à 180 mm³, soit une réduction de 87 % ²⁴⁷. Ces derniers travaux prouvent l'intérêt de telles particules pour la multi-délivrance de molécules : une faible concentration de siARN complexée et transfectée suffit à induire une forte inhibition fonctionnelle, tout en maintenant possible la multi-délivrance de molécules lipophiles au sein du cœur hydrophobe des particules.

Une autre stratégie possible *via* l'emploi de ces particules consiste à encapsuler les ARN interférents dans le cœur huileux, comme pour les SNALP. En prenant l'exemple des siARN, de par leur nature hydrophile, ces derniers nécessitent d'être modifiés : une pré-complexation avec une molécule liposoluble (cholestérol, PEI ²⁴⁸, DOTAP ²⁴⁹) favorise le maintien des siARN dans le cœur de la particule. Ainsi, il a été démontré une libération intracellulaire prolongée de siARN pré-complexés à du

PEI et encapsulés dans des NPLc. Cette libération sur la durée s'est traduite *in vitro* et *in vivo* par des effets d'ARNi prolongés pendant plus d'une semaine ²⁴⁸.

Les nanocapsules lipidiques

Les nanocapsules lipidiques (NCL) sont des nanovecteurs qui ont été pour la toute première fois formulées et caractérisées par Heurtault *et al.* ²⁵⁰. Elles sont préparées selon un procédé par inversion de phase dépendant de la température. La dilution de la formulation à la température d'inversion de phase conduit à la production des NCL. Le cœur huileux des nanocapsules est constitué de triglycérides comme Labrafac® WL 1349 ou Captex® 8000. La coque contient des lécithines tels que le Lipoïd® S75 et un tensioactif hydrophile, le Kolliphor® HS 15 (ou Solutol® HS 15, un mélange de polyéthylène glycol 660 libre et d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660). Les lécithines et le tensioactif sont destinés à stabiliser l'enveloppe de la nanocapsule. Le Kolliphor® HS 15 (Solutol® HS 15) permet aussi de limiter l'opsonisation. Le procédé d'obtention des nanocapsules avec un cœur huileux est très simple comme illustré dans la Figure 48. Des NCL de tailles allant de 20 nm à 200 nm peuvent être obtenues en faisant varier les quantités relatives d'huile et de tensioactif ²⁵¹. Les NCL peuvent être lyophilisées ²⁵² et transposées à grande échelle ²⁵³.

A l'image d'autres systèmes de délivrance de médicaments non viraux, les NCL ont été utilisées avec succès dans la vectorisation de siARN et miARN afin d'interférer avec l'expression de certains gènes ²⁵⁴. Par exemple, Resnier *et al.* ont pré-complexé des siARN avec des lipoplexes de 120 nm avant de réussir à en encapsuler 40 % dans des NCL ²⁵⁵. Une transfection *in vitro* de 37,5 ng de siARN par ce procédé a alors pu permettre une inhibition de 22 % d'un gène ciblé dans des cellules U87MG ²⁵⁵. Une augmentation des doses permet d'améliorer l'efficacité d'inhibition. Cependant, la cytotoxicité induite exige de rester à une concentration en siARN aux alentours de 37,5 ng ²⁵⁵.

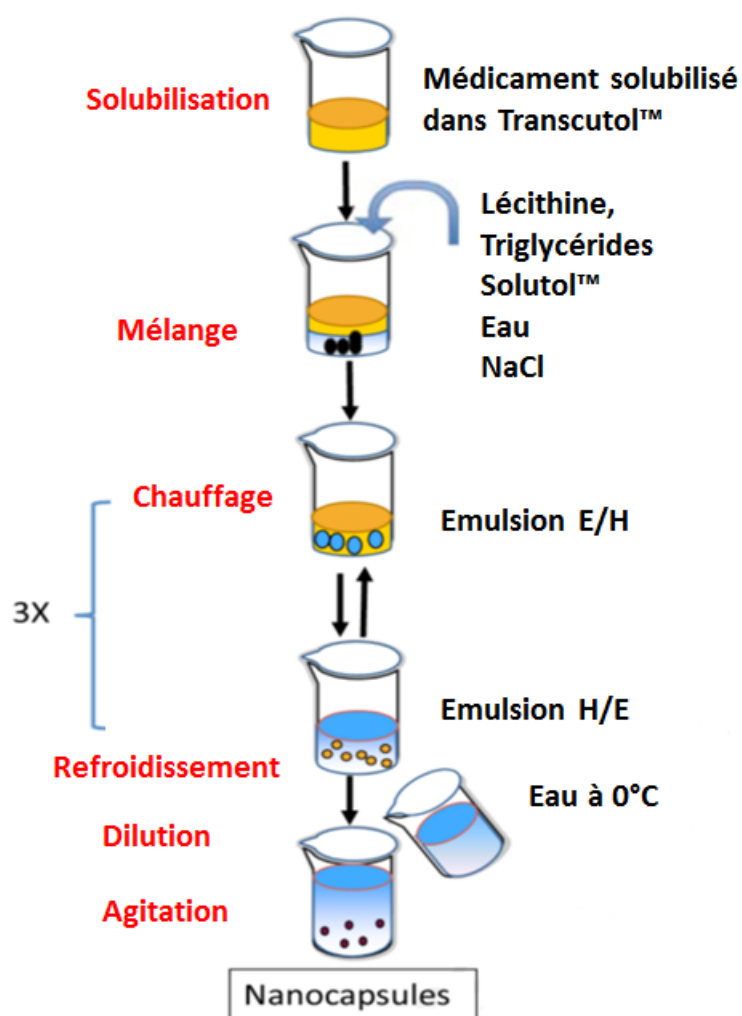


Figure 48 : étapes du procédé standard de formulation des nanocapsules lipidiques (NCL) avec encapsulation d'un médicament lipophile ²⁵⁴.

Les NCL ont été testées avec réussite *in vitro* ou *in vivo* pour délivrer des ADN ou ARN à des cellules cancéreuses afin de changer leurs phénotypes, offrant ainsi de meilleures possibilités pour les détruire. De nombreuses méthodes existent permettant d'associer des acides nucléiques aux NCL (encapsulation ou greffage en surface), toutes présentant des avantages. Par exemple, l'encapsulation de lipoplexes à ADN ou ARN dans les NCL permet une diminution significative de la consommation du complément, autorisant une demi-vie plus longue dans le sang des lipoplexes encapsulés par rapport aux lipoplexes libres. Par ailleurs, la stratégie de greffage en surface présente l'avantage de rendre les acides nucléiques plus facilement accessibles pour leurs cibles. Il est également possible avec les NCL de vectoriser un acide nucléique combiné à un agent anti-tumoral hydrophobe, comme

par exemple le paclitaxel ²⁵⁶. Les NCL peuvent aussi être fonctionnalisées, autorisant un ciblage au niveau cellulaire ou subcellulaire. Toutes ces innovations font des NCL des candidats prometteurs dans les thérapies anti-cancer, en association notamment avec des médicaments chimiothérapeutiques ²⁵⁴.

D) Conclusion sur les vecteurs synthétiques lipidiques

Entre les vecteurs polymériques et peptidiques, les vecteurs lipidiques (Tableau 7) se présentent comme un bon compromis. Leur structure proche de celle des cellules les rend moins toxiques que les vecteurs polymériques tandis que la possibilité d'inclure des lipides fusogènes les rend plus efficaces que les vecteurs peptidiques. Cette raison explique d'ailleurs pourquoi la plupart des agents de transfection commerciaux pour des applications *in vitro* sont des liposomes cationiques non-stabilisés. En revanche, ces mêmes liposomes montrent certaines lacunes, notamment en termes de stabilité, pouvant influencer sur leur efficacité, mais surtout sur la maîtrise et le contrôle de la transfection. Les SNALP, qui sont des liposomes cationiques plus stables, démontrent une efficacité de transfection fonctionnelle intéressante et sont régulièrement utilisés en essais cliniques. Cependant, leur utilisation *in vitro* reste limitée en raison du procédé de complexation, un lot de particules ne pouvant être associé qu'à un seul siARN encapsulé au cours de la formulation. Ainsi, pour étudier plusieurs siARN, la mise en place d'un protocole de complexation post-formulation des SNALP est rendu nécessaire. Enfin, les NPLc se présentent en bonne alternative des liposomes cationiques non-stabilisés et des SNALP. En effet, leur faible toxicité, combinée à un protocole de complexation post-formulation rapide, rend ces NP particulièrement intéressantes. La possibilité d'effectuer de la multi-délivrance constitue un avantage supplémentaire, notamment pour des applications multi-thérapeutiques. Cependant, ce type de vecteur nécessite d'être optimisé en raison d'une efficacité qui s'est montrée jusqu'ici insuffisante ⁴⁹.







	Liposomes cationiques instables		SNALP		Nanoparticules lipidiques cationiques	
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection - Échappement endosomal <i>Lipides fusogènes</i> - Complexation rapide 		<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection - Échappement endosomal <i>Lipides fusogènes</i> - Toxicité limitée - Furtivité par les polymères PEG 		<ul style="list-style-type: none"> - Échappement endosomal <i>Lipides fusogènes</i> - Toxicité limitée - Furtivité par les polymères PEG - Multifonctionnalité - Encapsulation de molécules hydrophobes (médicaments, fluorophores, ...) - Complexation rapide 	
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité possible - Manque de stabilité - Manque de contrôle de la transfection (variabilité) 		<ul style="list-style-type: none"> - Complexation pendant la formulation - limitation d'un lot de particule à un unique siARN 		<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité de transfection limitée 	
Applications possibles		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> - HTS Protocole à adapter suivant la stabilité du vecteur 		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> - <i>In vivo</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> limitées par l'efficacité - <i>In vivo</i> limitées par l'efficacité - HTS Limitées par l'efficacité
		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter - <i>In vivo</i> limitées par le manque de stabilité et par la toxicité 		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter - HTS 		<ul style="list-style-type: none"> - Cellules difficiles à transfecter

Tableau 7 : comparaison des différents vecteurs synthétiques lipidiques utilisés pour la transfection des ARN interférents ⁴⁹.

Conclusion de la deuxième partie

Après avoir discuté des mécanismes fondamentaux de l'ARNi dans la première partie, la deuxième partie a permis de décrire les différentes méthodes de transfection innovantes permettant d'apporter jusqu'aux cibles thérapeutiques des ARN interférents stables, biocompatibles et efficaces. Les NP offrent déjà des solutions satisfaisantes pour l'administration des acides nucléiques, et ce d'autant plus lorsqu'elles disposent de ligands permettant un adressage spécifique des molécules thérapeutiques ¹.

Alors que les mécanismes de l'ARNi étaient encore peu compris, des laboratoires se sont pourtant lancés dans la conception de transporteurs d'acides nucléiques dans l'espoir de parvenir le plus rapidement possible à des tests *in vivo* sur des animaux et dans des modèles de maladies humaines. Les premiers résultats d'administration systémique chez l'animal se sont révélés encourageants, présageant du fort potentiel thérapeutique des ARN interférents vectorisés. Rapidement, des essais cliniques utilisant ces technologies innovantes ont été initiés ¹. Dans la troisième et dernière partie de ce travail sera présenté un état des lieux en 2018 des recherches cliniques en médecine humaine testant ou ayant testées des thérapies basées sur l'ARNi.

Troisième partie : Médicaments utilisant l'interférence ARN, qui sont-ils et quels essais cliniques pour le marché pharmaceutique en 2018 ?

1. Généralités

1.1. Les différentes phases en essais cliniques

Ce n'est qu'après les nombreuses étapes du développement préclinique, avec notamment comme condition que les résultats de l'expérimentation animale aient été jugés prometteurs et non dangereux, que les premiers essais thérapeutiques sur l'Homme peuvent être réalisés. On parle alors de développement clinique ²⁵⁷. Les essais cliniques sont une étape obligatoire et systématique du développement d'un médicament. Ils permettent de préciser l'effet d'un traitement chez l'Homme, d'en déterminer l'efficacité ainsi que les éventuels effets indésirables. On distingue quatre phases dans les essais cliniques, chacune étant considérée comme un essai clinique séparé pour un même médicament en développement (Tableau 8) ².

LES PHASES SUCCESSIVES DE RECHERCHE ET DE DÉVELOPPEMENT D'UN MÉDICAMENT

	OBJECTIFS	DURÉE	EFFECTIFS	RÉSULTATS
PHASE I	- Sécurité du médicament - Étude du devenir dans l'organisme (PK)	De quelques jours/mois	Volontaires petit nombre	70 % des produits expérimentés franchissent le cap des essais de phase I
PHASE II	- Efficacité du produit - Détermination de la posologie optimale	de quelques mois à 2 ans	Petits groupes homogènes de patients (de 10 à 40)	Un tiers des produits testés franchissent le cap des essais de phases I et II
PHASE III	- Étude du rapport bénéfice/risque - Comparaison (SMR)	1 ou + années	Plusieurs centaines de malades	De 70 à 90 % des médicaments entrant en phase 3 sont retenus pour une demande d'AMM
À l'issue de la phase III, les résultats peuvent être soumis aux Autorités européennes de santé (EMA) pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM)				
PHASE IV	Essais réalisés une fois le médicament commercialisé sur un nombre de patients souvent très important (jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de personnes) - Meilleure connaissance du médicament - Évaluation de la tolérance à grande échelle : détecter des effets indésirables très rares non détectés en phase d'essais			

■ Les trois phases d'essais sont des étapes incontournables car leurs résultats conditionnent la mise sur le marché du nouveau médicament. Elles sont complétées d'études dites « post-AMM », car intervenant après la mise sur le marché du médicament, qui évaluent le médicament dans la « vraie vie », c'est-à-dire lorsqu'il est prescrit à grande échelle.

© Leem

Tableau 8 : les phases successives de recherche et de développement d'un médicament ²⁵⁷.

Les essais cliniques peuvent être publics ou privés, toutefois, 71 % des études cliniques sont lancées à l'initiative des entreprises du médicament. Il est à noter qu'il s'écoule de nombreuses années entre le début des essais thérapeutiques et l'autorisation de commercialisation d'un nouveau médicament, si commercialisation il doit y avoir ². Plusieurs raisons à cela :

- pour certaines pathologies, notamment les maladies chroniques, il peut être nécessaire d'attendre plusieurs mois avant de pouvoir observer un effet thérapeutique ;
- il peut être long de rassembler le nombre nécessaire de patients permettant de constituer un échantillon statistique représentatif d'un essai clinique défini car chacun des patients doit présenter l'ensemble des critères

d'inclusion indispensables à sa participation à l'essai ainsi que respecter les critères d'exclusion établis ;

- obtenir le consentement des patients que l'on souhaite recruter, ou de leur famille, peut nécessiter du temps ².

1.2. L'essor de l'ARNi interférence en essais cliniques

Le domaine de l'ARNi est en expansion constante depuis sa découverte en 1998 et l'identification des différents éléments impliqués dans son mécanisme. Un nombre remarquable d'études *in vivo* publiées décrivent le développement préclinique des siARN thérapeutiques, ainsi que des méthodes basées sur les siARN permettant de valider des cibles thérapeutiques pour de petites molécules ^{97,258}.

Les grandes sociétés pharmaceutiques et le monde académique se sont empressés d'exploiter les prouesses de l'ARNi pour accélérer la découverte et la validation de nouvelles molécules médicamenteuses, tandis que les entreprises de biotechnologies ont préféré placer leurs espoirs dans le développement de thérapeutiques innovantes. Cet essor de l'ARNi a d'ailleurs abouti à la création de nouvelles « start-up » qui se sont spécialisées dans ce domaine (Alnylam en 2002), mais également à des changements d'orientation de certaines entreprises auparavant spécialisées dans la recherche sur les ribozymes ou la stratégie antisens (Sirna Therapeutics en 2003) ². Par la suite, certaines grandes sociétés pharmaceutiques (Novartis, Merck...) ont rejoint ces entreprises de biotechnologies en établissant des collaborations pour le développement de nouvelles thérapeutiques. Plus de 30 entreprises pharmaceutiques ou biotechnologiques ont déclaré avoir un intérêt ou des programmes de développement en cours sur des thérapeutiques par ARNi (Annexe 1) ²⁵⁸.

Cette évolution dans le développement de nouvelles thérapeutiques a été rapide puisque la technologie d'ARNi est passée, en à peine 6 ans, des essais *in vitro* sur culture cellulaire au stade des essais cliniques sur l'Homme. Cette progression rapide est sans précédent en médecine, et démontre le potentiel de l'ARNi en thérapeutique ². Le premier essai clinique a été débuté fin 2004 chez des patients

souffrant de DMLA. Celui-ci testait un siARN (Bevasiranib) qui a montré à l'époque des résultats probants dans le « silencing » de l'ARNm ciblé (ARNm du VEGF A).

Compte tenu de la difficulté à développer des méthodes de transfection efficaces, les premiers essais ont surtout concerné des pathologies dans lesquelles l'administration de siARN restait possible et aisée. Ainsi, on retrouve des traitements contre des pathologies oculaires, l'œil étant facilement accessible pour des injections locales, mais aussi contre des pathologies respiratoires, les poumons pouvant être atteints par les voies aériennes supérieures. De même, les maladies hépatiques font l'objet d'essais thérapeutiques, puisque le foie est un organe naturellement impliqué dans la biodistribution des siARN ².

Une cartographie complète des essais cliniques enregistrés sur *ClinicalTrials.gov* qui testent des ARN interférents le plus souvent vectorisés est développée en Annexe 1. La Figure 49, quant à elle, donne une idée des proportions relatives des pathologies traitées par les siARN et/ou miARN dans les essais sur l'Homme.

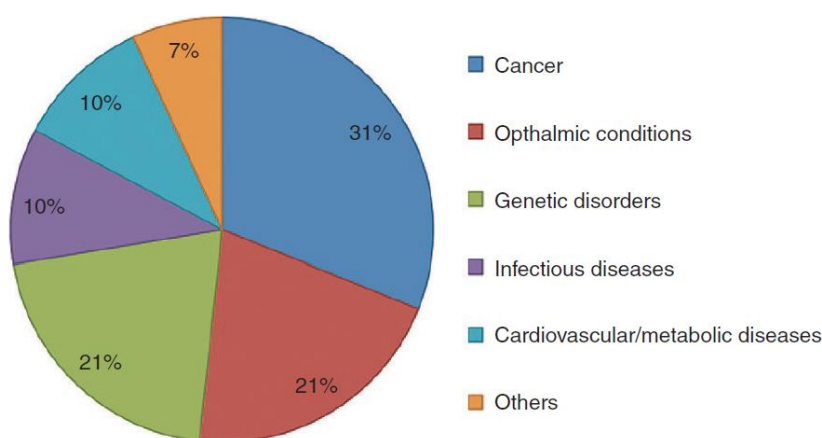


Figure 49 : indications des siARN et miARN ²⁵⁹.

L'importance des droits de brevet augmente de jour en jour dans le domaine de l'innovation. Les droits de brevet ne se limitent pas aux produits pharmaceutiques car ils sont devenus une pratique courante pour d'autres innovations. Le constat est établi que certaines techniques de biologie moderne nouvellement développées, comme celle des anticorps monoclonaux, sont soumises à ces droits ²⁶⁰. De même, d'autres candidats, comme ceux des médicaments biologiques, y sont également assujettis. À l'heure actuelle, l'innovation et les brevets jouent un rôle crucial dans le développement des produits biopharmaceutiques ²⁶¹. Ainsi, au cours de la dernière décennie, le nombre de brevets délivrés aux sociétés biopharmaceutiques a considérablement augmenté. Par conséquent, l'obtention des droits de brevet pour des thérapeutiques à base de petits ARN relève aujourd'hui d'une importance cruciale.

En effectuant une recherche sur le nombre total de brevets à l'aide des termes « microRNA » et « siRNA » dans la base de données américaine PatFT (<http://patft.uspto.gov/>) ainsi que dans celle de l'Office européen des brevets (<http://www.epo.org/searching-for-patents.html>), on constate qu'une majorité des brevets sont accordés pour des technologies utilisant des siARN plutôt que des miARN ²⁶². En effet, les effets « off-target » étant beaucoup plus fréquents avec ces derniers, l'obtention de brevets autorisant leur emploi s'en trouve plus difficile. Ces résultats sont illustrés dans l'Annexe 2. L'Annexe 3, quant à elle, présente les principaux brevets américains et européens déposés relatifs aux miARN et siARN.

L'industrie des biotechnologies est actuellement florissante. En Amérique, les revenus de cette industrie sont passés de 20 milliards de dollars en 1996 à 70,1 milliards de dollars en 2008. Par ailleurs, les dépenses en Recherche et Développement (*R&D*) ont augmenté de 10,8 à 30,4 milliards de dollars au cours de cette même période ²⁶³. L'industrie biopharmaceutique joue un rôle majeur dans l'industrie des biotechnologies car elle investit dans le développement de miARN et siARN thérapeutiques. Plusieurs industries biopharmaceutiques, tels que Alnylam Pharmaceuticals, Rosetta Genomics et Regulus Therapeutics, se sont développées au cours des 25 dernières années (Figure 50), et investissent dans ces nouvelles molécules. Cependant, un défi majeur se présente pour ces petites entreprises en raison de la volatilité financière du milieu ^{264,265}. Les Big Pharma utilisent ces petites

industries pour développer de nouvelles molécules dès les phases de R&D et jusqu'aux essais cliniques. Les Big Pharma parient sur l'ARNi afin d'entrer sur le marché le plus tôt possible et commercialiser de nouvelles molécules thérapeutiques.

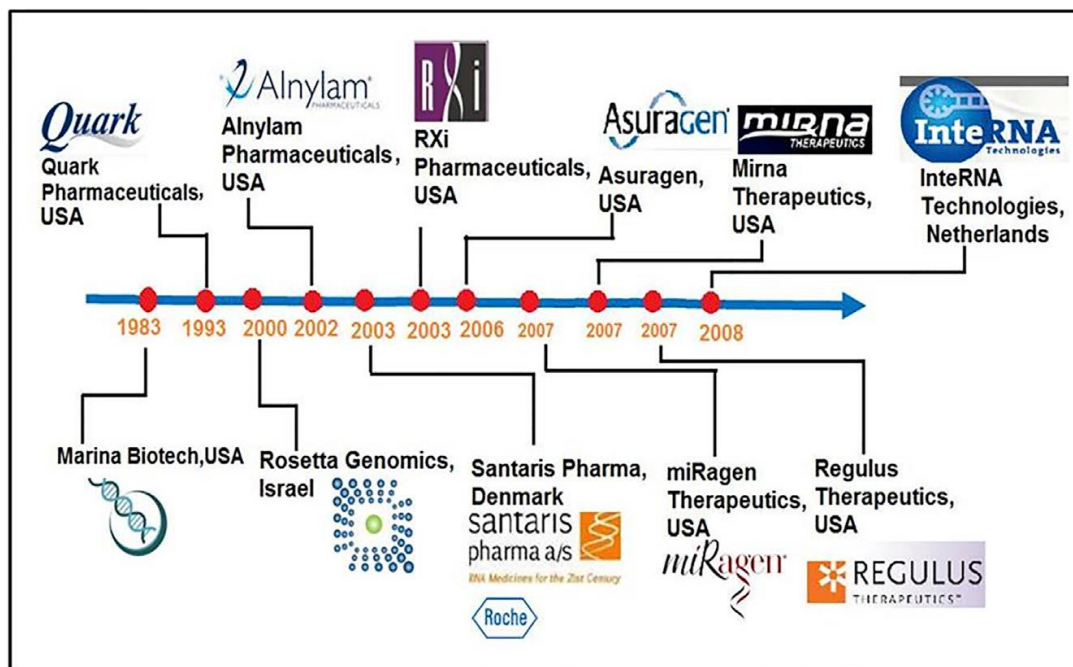


Figure 50 : liste des sociétés biopharmaceutiques développant des thérapies à base de miARN et siARN ²⁶².

2. Principaux siARN en cours dans les essais cliniques

Il est correctement établi que les siARN sont avant tout des thérapies ayant pour principal effet d'inhiber l'expression de certains gènes ²⁶⁶. Par conséquent, ce sont les sociétés biopharmaceutiques qui se mobilisent pour permettre l'entrée sur le marché de produits basés sur les acides nucléiques. Plus de 14 programmes thérapeutiques utilisant l'ARNi sont entrés dans des essais cliniques au cours de la dernière décennie (Figure 51).

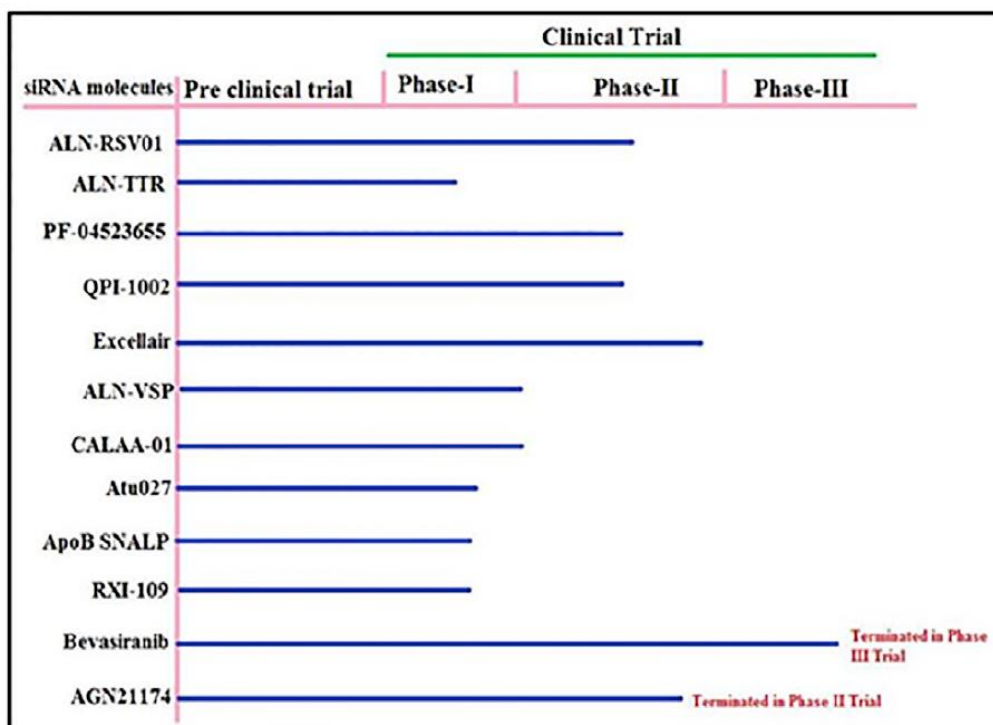


Figure 51 : différentes molécules de siARN testées dans des essais cliniques et leur état d'avancement ²⁶².

La base de données *ClinicalTrials.gov* référence les essais cliniques enregistrés testant ou ayant testés des thérapies basées sur l'ARNi. Environ 1 500 patients et volontaires sains ont été recrutés dans des programmes cliniques utilisant des siARN thérapeutiques ²⁶⁷. Ci-après seront présentés plusieurs siARN ayant un fort potentiel thérapeutique et qui sont expérimentés actuellement en recherche clinique.

2.1. Principaux siARN testés en ophtalmologie

2.1.1. Pf-04523655 (Pf-655)

Mécanisme d'action

PF-04523655 est un siARN conçu pour inhiber la protéine RTP801 chez les personnes atteintes de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Les patients présentant une néovascularisation choroïdienne secondaire à la DMLA, ainsi qu'une rétinopathie diabétique, surexpriment RTP801 qui est un gène inductible par l'hypoxie. Ce gène joue donc un rôle dans la pathogenèse de la maladie ^{268–270}. En ce qui concerne la structure du siARN, PF-04523655 se présente sous la forme d'un

duplex de 19 ribonucléotides, stabilisé par l'introduction de groupes 2'-méthoxy au niveau du ribose (2'-O-Me), comme le montre l'Annexe 4 ^{271,272}. Des études de « silencing » par ARN ont été réalisées après injection intravitréenne (IVT) de PF-04523655 ²⁷³. Il s'agissait de la même procédure que pour le ranibizumab (Lucentis®), un traitement standard de la DMLA basé sur l'inhibition du VEGF ²⁷⁴. Même en étant un siARN « nu », dans des essais *in vitro* et *in vivo*, PF-04523655 a démontré sa capacité à pénétrer les cellules rétinienne sans l'aide d'aucun réactif de transfection et de pouvoir réprimer le gène RTP801 ²⁷⁵.

Principaux essais cliniques avec le PF-04523655

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT00713518	<i>Phase II Open Label Multicenter, Prospective, Randomized, Age Related Macular Degeneration, Comparator Controlled Study Evaluating PF-04523655 Versus Ranibizumab In The Treatment Of Subjects With Choroidal Neovascularization (MONET Study).</i>	2	Complété	Le but de l'étude est d'évaluer si le PF-04523655 est efficace dans le traitement de la DMLA et à quelle dose.
NCT01445899	<i>An Open-Label Dose Escalation Study of PF-04523655 (Stratum I) Combined With a Prospective, Randomized, Double-Masked, Multi-Center, Controlled Study (Stratum II) Evaluating the Efficacy and Safety of PF-04523655 Alone and in Combination With Ranibizumab Versus Ranibizumab Alone in Diabetic Macular Edema (MATISSE STUDY).</i>	2	Complété	C'est une étude en deux parties. La première partie est une étude ouverte, d'escalade de dose, d'innocuité, de tolérance et de pharmacocinétique, où le médicament à l'étude (PF-04523655) sera administré à tous les patients. La seconde partie est une étude prospective randomisée, multicentrique, à double insu et évaluant l'efficacité et la tolérance du PF-04523655 seul et en association avec le ranibizumab versus le ranibizumab seul chez des patients atteints de DME.

Analyse critique

PF-04523655 utilise la voie d'administration IVT, une procédure standard identique à celle du ranibizumab. Cette voie nécessite l'assistance d'un ophtalmologiste pour la surveillance du schéma posologique, avec des injections tous les 2-4 semaines pendant huit semaines, ou 6 injections mensuelles. L'administration régionale apporte généralement un avantage significatif, celui d'administrer une dose réduite, rendant le traitement moins cher. En effet, 1 ou 3 mg

de PF-04523655 sont requis par administration, une quantité relativement faible en comparaison des autres médicaments qui seront exposés par la suite ²⁷⁵. Il n'a pas été nécessaire de formuler des NP pour vectoriser ces siARN ce qui a permis également de réduire les coûts. Une limitation significative à l'utilisation du PF-04523655 est son efficacité, car celui-ci ne s'est pas montré supérieur au ranibizumab (anti-VEGF) chez les patients atteints de DMLA. Le PF-04523655 a seulement montré une tendance à augmenter l'acuité visuelle lorsqu'il est administré en association avec le ranibizumab, mais sans améliorer l'histopathologie de la maladie. Malgré l'intérêt de Pfizer qui a obtenu une licence pour cette technologie, il peut être difficile de convaincre les organisations de remboursement d'y participer financièrement. En effet, un traitement standard pour la DMLA donne déjà des résultats raisonnablement bons ²⁷⁵. Cependant, le PF-04523655 peut être priorisé s'il est confirmé que les agents anti-VEGF participent potentiellement à la progression de l'atrophie géographique chez les patients atteints de DMLA ^{276–278}. Enfin, la mise en place d'une étude de phase 2, toujours avec le PF-04523655, est attendue pour les patients atteints d'Œdème maculaire diabétique (*OMD*).

2.1.2.QPI-1007

Mécanisme d'action

La perte des cellules ganglionnaires rétiniennes (*CGR*) est une caractéristique des maladies ophtalmiques entraînant une déficience visuelle ainsi qu'une cécité tels que la neuropathie optique ischémique antérieure non artéritique (*NOIAM*) et le glaucome ^{279–281}. Comme l'apoptose est un phénomène clé à l'origine de la perte des *CGR*, les protéines impliquées dans les voies apoptotiques en deviennent des cibles thérapeutiques attrayantes. La caspase-2 est une protéine exprimée par les *CGR* lors d'une blessure. Les traitements inhibant cette protéine pro-apoptotique ont déjà montré des effets neuroprotecteurs ^{282–284}. QPI-1007 est un siARN injecté par voie IVT ciblant la caspase-2 et développé pour protéger les *CGR* dans les neuropathies optiques ²⁸⁵. Il s'agit d'un duplex d'ARN « nu » de 19 nucléotides comportant des nucléosides 2'-O-méthylés au niveau du brin guide. Le brin passager contient quant à lui des modifications chimiques à ses deux extrémités, comme montré en Annexe 5 ²⁸⁶. Le brin guide du QPI-1007 peut s'apparier avec les nucléotides 240-258 de la séquence d'ARNm codant pour la caspase-2 humaine (Annexe 5).

Principaux essais cliniques avec le QPI-1007

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT01064505	<i>A Phase I Open-Label, Dose Escalation Trial of QPI-1007 Delivered by a Single Intravitreal Injection to Patients With Optic Nerve Atrophy (Stratum I) and Acute Non-Arteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy (NAION) (Stratum II)</i>	1	Complété	Il s'agit d'une étude ouverte, d'escalade de dose, d'innocuité, de tolérance et de pharmacocinétique, dans laquelle le médicament à l'étude (QPI-1007) est administré à tous les patients participants. Cette étude détermine si le QPI-1007 est sûr lorsqu'il est injecté dans l'œil. L'étude recherche également la présence ou non d'effets secondaires liés au médicament et le temps nécessaire dont le corps a besoin pour l'éliminer.
NCT01965106	<i>Phase IIA Double-Masked Randomized Sham-Controlled Trial of QPI-1007 Delivered by a Single Intravitreal Injection to Subjects With Acute Primary Angle-Closure Glaucoma (APACG)</i>	2	Complété	Cette étude a évalué tous les effets secondaires pouvant se produire lorsque le QPI-1007 était injecté dans l'œil de sujets atteints d'un glaucome primitif à angle fermé, ainsi que le temps nécessaire à l'organisme pour éliminer ce médicament. Cette étude a permis également de tester si le QPI-1007, injecté dans l'œil, aidait à prévenir des dommages structuraux du tissu nerveux oculaire et de la perte de la fonction visuelle chez les sujets atteints de glaucome primitif à angle fermé.
NCT02341560	<i>A Phase 2/3, Randomized, Double-Masked, Sham-Controlled Trial of QPI-1007 Delivered By Single or Multi-Dose Intravitreal Injection(s) to Subjects With Acute Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy (NAION)</i>	2/3	En cours de recrutement	Cette étude permettra de déterminer l'effet du QPI-1007 sur la fonction visuelle de sujets atteints d'une NOIAN d'apparition récente ainsi que d'évaluer l'innocuité et la tolérabilité des injections IVT de QPI-1007 dans cette population. Cette étude évaluera également les changements structuraux dans la rétine après administration de QPI-1007.

Analyse critique

Le QPI-1007 a suivi la même stratégie que le QPI-1002, dans la mesure où il peut réprimer une protéine apoptotique impliquée dans la mort cellulaire. Comparé au QPI-1002, le QPI-1007 est un siARN comportant beaucoup plus de modifications chimiques dans sa structure ce qui permet d'améliorer son activité d'extinction. Sa cible est la caspase 2, une enzyme qui déclenche l'apoptose des cellules rétiniennes dans les neuropathies optiques ischémiques comme la NOIAN ²⁷⁵. Le médicament est injecté par voie IVT, comme le PF-04523655, nécessitant donc aussi l'assistance d'un ophtalmologiste. Bien que le QPI-1007 ait amélioré l'acuité visuelle et stabilisé la

progression de la maladie, les données n'ont été comparées qu'avec des témoins historiques. Une étude contrôlée de phase 2 doit permettre de vérifier si les avantages observés sont statistiquement significatifs ²⁷⁵. D'un point de vue du marché, le QPI-1007 peut être utile pour d'autres maladies oculaires qui entraînent une perte de l'acuité visuelle et de la cécité (comme le glaucome, par exemple), étant donné qu'il empêche l'apoptose des cellules rétinienne. En effet, Quark a obtenu un brevet du *United States Patent Trademark Office* sur l'utilisation du QPI-1007 dans le traitement des patients atteints de NOIAN ²⁸⁷. Les effets protecteurs de ce siARN sur les cellules rétinienne, ainsi que sa capacité conséquente à améliorer la fonction visuelle doivent être confirmés dans un essai de phase 2/3 chez des patients atteints de NOIAN ²⁷⁵.

2.1.3.SYL040012 (Bamosiran)

Mécanisme d'action

SYL040012 est un siARN ciblant le récepteur β 2-adrénérique, désigné afin de traiter le glaucome ²⁸⁸. Le glaucome est une maladie ophtalmique entraînant une déficience visuelle puis une cécité suite à la dégradation progressive du nerf optique ²⁸⁹. Les principaux facteurs de risque du glaucome sont une pression intraoculaire (PIO) élevée, des antécédents génétiques et ethniques, ainsi que l'âge ²⁹⁰. Cette PIO excessive est causée par un déséquilibre de la quantité d'humeur aqueuse (HA) en raison d'une trop forte production de cette dernière vis-à-vis de son drainage ²⁹¹. Les médicaments qui réduisent la production d'HA et contrôlent la PIO sont précieux pour les patients atteints de glaucome. Les β -bloquants produisent cet effet et peuvent être prescrits dans cette maladie ²⁹². Au lieu de bloquer les récepteurs β , une autre stratégie consiste à empêcher la traduction des ARNm correspondants grâce à l'ARNi. SYL040012 est un siARN synthétique « nu » de 21 bases ciblant les ARNm des récepteurs β 2-adrénériques ²⁷⁵.

Principaux essais cliniques avec le SYL040012

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT00990743	<i>Phase I Study With SYL040012. Tolerance and Effect on Intraocular Pressure</i>	1	Complété	Le but de cette étude était de déterminer si le SYL040012 était une molécule sans danger afin de traiter l'hypertension oculaire et le glaucome.
NCT01227291	<i>Study With SYL040012. Tolerance and Effect on Intraocular Pressure in Subjects With IOP \geq 21 mm Hg</i>	½	Complété	Le but de cette étude était d'évaluer la tolérance et l'effet du SYL040012 sur des sujets non médicamenteux et avec une PIO élevée.
NCT01739244	<i>Dose Finding Clinical Trial With SYL040012 to Evaluate the Tolerability and Effect on Intraocular Pressure in Subjects With Ocular Hypertension or Open Angle Glaucoma</i>	2	Complété	Le but de cet essai clinique de détermination de dose était d'évaluer la tolérabilité systémique, la tolérabilité locale et l'effet sur la réduction de la PIO de trois doses différentes de SYL040012 chez des sujets atteints d'hypertension oculaire ou de glaucome à angle ouvert.
NCT02250612	<i>A Phase II, Observer Masked, Active Controlled Study of SYL040012 for the Treatment of Elevated Intraocular Pressure in Patients With Open-angle Glaucoma or Ocular Hypertension</i>	2	Complété	Le but de cette étude contrôlée, randomisée, en double-aveugle était d'évaluer l'innocuité et l'efficacité hypotensive oculaire de quatre doses différentes de collyres à base de SYL040012 (bamosiran) en comparaison du maléate de timolol 0,5 % et après 28 jours de traitement chez des patients présentant une PIO élevée.

Analyse critique

Le SYL040012 cible le glaucome, une maladie actuellement traitée par des prostaglandines ou bien par des collyres contenant des antagonistes des récepteurs β . Les analogues de la prostaglandine ont été prescrits préférentiellement aux β -bloquants en raison d'un profil de tolérance plus adapté et d'une meilleure compliance des patients ²⁹². Le rationnel du SYL040012 en tant que médicament supprimeur sélectif des β_2 est intéressant au vu de sa sécurité. En effet, des inhibiteurs non sélectifs comme le timolol sont partiellement contre-indiqués chez certains patients souffrant de problèmes cardiaques ²⁹³. Ainsi, il y a un risque de passage systémique à partir du système lacrymal et de survenue d'effets secondaires suite au blocage des récepteurs cardiaques β_1 ²⁹⁴. De plus, la suppression des récepteurs β_2 par le SYL040012 pourrait provoquer une bronchoconstriction chez des patients souffrant d'asthme ou de maladies pulmonaires obstructives chroniques ²⁹⁵. Fort heureusement, les études de phase 1

n'ont pas détecté le médicament dans la circulation sanguine, probablement en raison de l'attaque rapide des ribonucléases plasmatiques sur les molécules de siARN non protégées par des modifications chimiques (liaisons phosphorothioate) ou dans une NP. En fait, le SYL040012 a provoqué moins d'événements indésirables que le timolol ²⁷⁵.

Ce siARN a montré une forte activité en comparaison du placebo. Cependant, elle n'était pas équivalente à celle du timolol, sauf chez les patients présentant une PIO élevée, ce qui réduit le marché potentiel du SYL040012. La quantité totale journalière de 13 mg (28 doses quotidiennes X 450 µg par dose) est relativement élevée pour un siARN en collyre. Ainsi, la relation coût-bénéfice reste problématique ²⁷⁵. D'un point de vue général, le SYL040012 a été le premier siARN testé chez l'homme pour une utilisation topique oculaire, et a donc contribué à l'émergence des biotechnologies à base d'ARNi. À cette époque, les modifications chimiques sur les molécules de siARN permettant d'augmenter la durée d'activité (squelettes phosphorothioatés pour éviter l'attaque des ribonucléases) et la spécificité pour la cible (LNA) n'étaient pas encore maîtrisées. Mêmes les nanovecteurs à usage *in vivo* n'en étaient qu'à leurs balbutiements ²⁷⁵. La question est donc de savoir dans quelle mesure cette plate-forme biotechnologique pourrait s'améliorer en termes d'efficacité et de schéma posologique si elle bénéficiait des nouvelles technologies, tels que : 1) des modifications chimiques dans la structure des siARN ; 2) la délivrance par des NP ; 3) des changements structurels du siARN pour obtenir un oligonucléotide antisens simple-brin, comme un GapmeR par exemple, qui peut être formulé dans des particules ou être administré « nu » ²⁷⁵.

2.1.4.SYL1001

Mécanisme d'action

SYL1001 est un siARN utilisé dans la prévention et le traitement des douleurs oculaires ainsi que du syndrome de l'œil sec, formulé directement en collyre pour administration topique et donc sans recourir à un vecteur. La cible du SYL1001 est l'ARNm du récepteur vanilloïde TRPV1 (*transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1*), un nocicepteur présent dans la cornée et ses terminaisons nerveuses respectives ²⁹⁶.

Principaux essais cliniques avec le SYL1001

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT01438281	<i>Study to Evaluate the Ocular Tolerance of SYL1001 in Healthy Volunteers</i>	1	Complété	Le but de cette étude était de déterminer si l'administration de SYL1001 est sans danger pour la prévention et le traitement des douleurs oculaires ainsi que du syndrome de l'œil sec.
NCT01776658	<i>Pilot Study to Evaluate SYL1001 Safety and Effect in Patients With Ocular Pain</i>	½	Complété	Le but de cette étude pilote était de comparer l'effet analgésique du SYL1001 versus placebo chez des patients souffrant de douleurs oculaires associées au syndrome de l'œil sec. Les tolérabilités aux niveaux général et local étaient également évaluées.
NCT02455999	<i>Dose-finding Study to Assess the Safety and Effect of SYL1001 in Patients With Ocular Pain</i>	2	Complété	Le but de cette étude pilote était de comparer l'effet analgésique de deux concentrations de collyres à base de SYL1001 versus placebo chez des patients souffrant de douleurs oculaires associées au syndrome de l'œil sec. Les tolérabilités aux niveaux général et local étaient également évaluées.

Analyse critique

Le traitement de la sécheresse oculaire relève d'un défi en ophtalmologie, et comprend des cyclosporines, des médicaments anti-inflammatoires, des larmes artificielles, ainsi que d'autres médicaments ^{297,298}. Le SYL1001 n'agit pas contre la pathogenèse de la maladie. Cependant, il se présente comme un bon analgésique contre les douleurs oculaires car il bloque la signalisation neuronale à la racine, au niveau des nocicepteurs TRPV1. La dose administrée du SYL1001 est modérée, rendant l'idée de traitement abordable. À 450 µg / œil / jour, il provoque une analgésie, et un régime de 10 jours exigera 4,5 mg de siARN par œil. D'autres cycles de traitement pourraient être nécessaires pour ces troubles oculaires chroniques ²⁷⁵. Une étude de phase 2 avec ≈ 130 individus a montré un effet analgésique significatif lorsque la concentration testée était de 450 µg par œil (1,125 %). Dans la mesure où la douleur est un symptôme clinique présent dans d'autres maladies oculaires prévalentes, le marché pharmaceutique du SYL1001 est significatif ²⁷⁵. Concernant la sécheresse oculaire, il s'agit d'un trouble complexe dans la prise en charge thérapeutique. Le SYL1001 serait utilisé seulement pour son effet analgésique, ne remplaçant pas une cyclosporine en tant qu'agent immunosuppresseur, ou d'autres médicaments pour le soulagement symptomatique. De ce fait, une étude de phase III multicentrique est nécessaire afin de savoir si ce siARN se montre efficace et bien toléré chez un plus grand nombre d'individus ²⁷⁵.

2.2. Principal siARN testé en néphrologie : QPI-1002 (I5NP)

Mécanisme d'action

Le QPI-1002 a été conçu pour protéger les cellules des tubules proximaux en cas de lésions rénales associées à une ischémie ou à une quelconque néphrotoxicité. L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est le terme désignant un syndrome clinique caractérisé par une diminution rapide de la fonction rénale excrétoire ²⁹⁹. L'IRA se présente comme un problème de santé important en raison de son incidence, du taux de mortalité et du risque pour les patients de développer une maladie chronique dépendante de la dialyse ^{300,301}. La mort des cellules rénales par apoptose joue un rôle important dans la pathogenèse de l'IRA, quelle que soit son étiologie : ischémie, septicémie ou lésion néphrotoxique ³⁰². Ainsi, l'inhibition des voies apoptotiques dans les cellules rénales lésées serait utile pour soigner l'IRA. Le siARN QPI-1002 a été conçu pour réduire au silence l'ARNm de la protéine pro-apoptotique p53 dans les cellules tubulaires proximales, diminuant ainsi les lésions provoquées par ischémie-reperfusion. Il s'agit d'un duplex « nu » de 19 paires de bases et 2'-O méthylé ³⁰³. QPI-1002 a été le premier siARN administré par voie systémique chez l'Homme, via la voie IV. Les siARN injectés par voie IV ont une pharmacocinétique particulière : ils sont intériorisés principalement par les cellules rénales et hépatiques ³⁰⁴. Ce mode de distribution a été confirmé dans diverses études avec des duplex d'ARN et, en outre, avec des oligonucleotides d'ADN antisens monocaténaire ^{305–309}. Comme le rein est une cible pour des oligonucléotides injectés en IV, les maladies rénales ont donc tout naturellement attiré l'attention des thérapeutiques à base de siARN.

Principaux essais cliniques avec le QPI-1002

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT00802347	<i>Controlled, Randomized, Prospective, Double-Blind, Multicenter, Phase I/II, Dose-Escalation Study of the Safety, PK, and Clinical Activity of I5NP for Prophylaxis of Delayed Graft Function in Patients Undergoing Deceased Donor Kidney Transplantation</i>	½	Complété	Le but de cette étude est de déterminer si une seule administration de QPI-1002 (également connu sous le nom de I5NP) peut prévenir la RRF chez des patients subissant une transplantation rénale à partir d'un donneur décédé. Dans cette étude de phase I/II, ces patients subissant une transplantation rénale seront étudiés afin d'évaluer l'innocuité et le profil pharmacocinétique du I5NP ainsi que son activité clinique. Les données de cette étude seront utilisées pour identifier les doses de I5NP à appliquer dans les études d'efficacité subséquentes.
NCT02610283	<i>A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Phase 2 Study to Evaluate the Efficacy and Safety of QPI-1002 for the Prevention of Acute Kidney Injury in Subjects at High Risk for AKI Following Cardiac Surgery</i>	2	Complété	Cet essai compare et évalue le QPI-1002 versus placebo dans la prévention de l'IRA chez des sujets présentant un risque élevé d'IRA suite à une chirurgie cardiaque. La moitié des participants recevront le QPI-1002 tandis que l'autre moitié recevra le placebo.
NCT02610296	<i>A Phase 3, Randomized, Double-blind, Placebo Controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of QPI-1002 for Prevention of Delayed Graft Function in Recipients of a Donation After Brain Death Older Donor Kidney Transplant</i>	3	En cours de recrutement	Le but de cet essai est d'évaluer la réduction de l'incidence et de la sévérité de la reprise retardée de fonction en cas d'allogreffes rénales à partir de donneurs > 45 ans eux-mêmes dans un état de mort cérébrale.

Analyse critique

QPI-1002 cible l'IRA, une maladie rénale sévère nécessitant souvent la dialyse, ce qui constitue à la fois une contrainte importante ainsi qu'un processus coûteux. La justification thérapeutique est de supprimer la protéine p53 pro-apoptotique afin de limiter la mort des cellules rénales et donc de préserver la physiologie des reins. Cependant, le critère d'évaluation prévu qui est celui de réduire de 30 % la reprise retardée de fonction du greffon - une forme d'IRA liée aux transplantations – n'a pu être atteint que chez certains individus ²⁷⁵. En effet, la capacité de QPI-1002 à diminuer le recours à la dialyse chez les patients ayant subi une transplantation rénale ne représente qu'une tendance. L'efficacité reste donc un point critique pour

cette molécule. En revanche, ce siARN possède de nombreuses propriétés positives : (1) en tant que siARN « nu », il peut être un médicament relativement peu cher ; (2) le traitement est par voie IV, couramment utilisée dans les hôpitaux ; (3) cette voie favorise la distribution du QPI-1002 aux cellules rénales cibles ; (4) une seule administration de QPI-1002 (10 mg/kg) est nécessaire, ce qui donne une quantité totale de 700 mg pour un patient de 70 kg ²⁷⁵. Si la phase III en cours donne des résultats positifs, le statut de « médicament orphelin » pour QPI-1002 pourrait accélérer son accès au marché pharmaceutique. En ce sens, Novartis a investi 10 millions de dollars dans son développement et sa commercialisation ³¹⁰.

2.3. Principaux siARN testés en cancérologie

2.3.1. TKM-080301 (TKM-PLK1)

Mécanisme d'action

Le TKM-080301 cible l'ARNm de la PLK1, une protéine surexprimée dans les cellules cancéreuses et qui favorise la prolifération cellulaire incontrôlée ³¹¹. Certains inhibiteurs de la PLK1 font déjà l'objet d'essais cliniques chez l'humain en tant que traitements anticancéreux ³¹². En ce qui concerne le TKM-080301, il s'agit d'un siARN administré par voie IV et formulé dans des SNALP, comme montré en Annexe 6 ^{313,314}. Ce médicament est développé par Tekmira, société connue sous le nom d'Arbutus Biopharma Corp. depuis 2015.

Principaux essais cliniques avec le TKM-080301

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT01262235	<i>A Phase 1/2 Dose Escalation Study to Determine the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Intravenous TKM-080301 in Patients With Advanced Solid Tumors</i>	½	Complété	Cette étude était un essai de phase I / II, ouvert, non randomisé, de recherche de dose mené dans plusieurs centres cliniques. L'étude visait à déterminer l'innocuité, la tolérabilité et la pharmacocinétique du TKM-080301 chez des patients adultes atteints de tumeurs solides ou de lymphomes réfractaires aux traitements standards ou pour lesquels il n'existait pas de traitement standard. Après détermination de la dose maximale tolérée, cette dose était utilisée dans une cohorte d'expansion ou chez des sujets atteints de tumeurs neuroendocrines réfractaires ou d'un carcinome adrénocortical.
NCT02191878	<i>Open-Label, Multi-Center, Phase 1, Dose Escalation Study With Phase 2 Expansion Cohort to Determine the Safety, Pharmacokinetics and Preliminary Anti-Tumor Activity of Intravenous TKM-080301 in Subjects With Advanced Hepatocellular Carcinoma</i>	½	Complété	Cette étude avait plusieurs objectifs : <ul style="list-style-type: none"> • Tester l'innocuité et la tolérabilité du TKM-080301 chez des sujets atteints d'un carcinome hépatocellulaire avancé ; • Trouver la plus forte dose de TKM-080301 pouvant être administrée sans causer d'effets secondaires, appelée dose maximale tolérée ; • Fournir une évaluation préliminaire de l'activité anti-tumorale du TKM-080301.

Analyse critique

Le schéma thérapeutique proposé pour le TKM-080301 (18 cycles ; 3 injections par cycle ; 0,75 mg / kg et par injection) résulte en une quantité élevée de siARN injecté (≈ 2800 mg), mais montre aussi une activité antitumorale chez environ 50 % des patients qui étaient atteints soit de carcinome hépatocellulaire avancé, soit de cancer corticosurrénalien réfractaire. Comme la PLK1 est dérégulée dans divers types de cancer, ce siARN pourrait bénéficier d'un marché accru à l'avenir ²⁷⁵. Cependant, la PLK1 est une cible déjà testée par d'autres molécules. Les inhibiteurs de la PLK en cours d'essais cliniques (tel que le volasertib en phase 3) seraient des concurrents potentiels du TKM-080301 ³¹⁵. Concernant les effets indésirables de celui-ci, les patients ont présenté des réactions d'intensités légères à modérées liées à la perfusion avec une augmentation des cytokines, une conséquence fréquente des siARN vectorisés par des lipides et administrés par voie IV. Le coût de cette

thérapie pourrait être considérée comme acceptable si les phases 2 et 3 confirment les impressionnants résultats préliminaires ²⁷⁵.

2.3.2. Atu027

Mécanisme d'action

Atu027 est un siARN synthétisé chimiquement capable de provoquer l'extinction de l'ARNm codant pour la protéine kinase N3 (*PKN3*). PKN3 est un effecteur que l'on retrouve dans les tissus hautement vascularisés ^{235,316}. Agissant comme un médicament « modulant l'endothélium », Atu027 stabilise l'intégrité des vaisseaux, contrecarre l'inflammation dans la région tumorale et réduit la propagation des cellules métastatiques ^{236,317}. Atu027 est formulé au sein de particules lipidiques (lipoplexes-siARN, AtuPlex[®]) pour une administration systémique. *In vivo*, ces lipoplexes délivrent les siARN ayant pour cible PKN3 jusqu'au cytoplasme des cellules endothéliales vasculaires. Les lipoplexes se forment en surface des liposomes chargés positivement grâce à la complexation avec ces liposomes des siARN chargés négativement ⁸⁴. Les quatre composants du Atu027 sont donc les suivants : 1- le siARN ciblant la PKN3 et décrit ci-dessus ; 2- le lipide cationique AtuFect1 ; 3- un lipide fusogène neutre ; 4- un lipide PEGylé ^{84,235}.

Principaux essais cliniques avec le Atu027

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT00938574	<i>A Prospective, Open-label, Single Center, Dose Finding Phase I-study With Atu027 (an siRNA Formulation) in Subjects With Advanced Solid Cancer</i>	1	Complété	Il s'agit d'une étude de phase I prospective, ouverte, monocentrique, de recherche de dose, testant le Atu027 (formulation de siARN) administré en traitement unique puis en traitement répété (phase de traitement répété : 8 traitements en 4 semaines) afin de traiter des sujets atteints de tumeurs solides avancées.
NCT01808638	<i>A phase Ib/IIa study of combination therapy with gemcitabine and Atu027 in subjects with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma</i>	½	Complété	Le but de l'étude était d'évaluer une nouvelle stratégie de traitement du cancer du pancréas avancé en combinant le nouveau médicament expérimental Atu027 avec un chimiothérapeutique standard à base de gemcitabine. Cette combinaison vise à améliorer l'activité anti-tumorale de la gemcitabine grâce à l'Atu027.

Analyse critique

Le traitement du cancer du pancréas reste un grand défi à relever en oncologie³¹⁸. Atu027 est un siARN anticancéreux vectorisé possédant des propriétés anti-angiogéniques et anti-métastatiques. Il nécessite une dose plus faible (0,336 mg / kg) et moins d'injections (n = 8) que le TKM-080301, résultant en une dose totale injectée (≈ 190 mg) moins élevée (8 injections X 0,336 mg / kg X 70 kg). L'injection par voie IV a augmenté le niveau des protéines C3, indiquant une activation immunitaire²⁷⁵. Le cancer du pancréas est une maladie très agressive et métastatique³¹⁹. Ainsi, Atu027 a déjà été associé à la gemcitabine contre cette maladie, la combinaison ayant amélioré le taux de survie sans progression chez des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique avancé et métastatique. Ce siARN est une alternative prometteuse pour les patients atteints d'un carcinome pancréatique incurable et sera examiné prochainement dans une étude clinique de phase III²⁷⁵.

2.3.3.siG12D-LODER

Mécanisme d'action

siG12D-LODER est un complexe polymérique conçu pour une administration locale prolongée d'un siARN ciblant la mutation KRAS G12D et développé afin de traiter le cancer du pancréas humain^{320,321}. La mutation G12D correspond à un changement d'acide aminé en position 12 dans KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), avec une glycine (G) remplacée par un aspartate (D). Comme le montre l'Annexe 8, LOcal Drug EluteR (LODER) est une matrice polymérique de PLGA prenant la forme d'une petite tige cylindrique de diamètre 0,8 mm et de longueur $5,5 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ ²⁷⁵.

Principaux essais cliniques avec le siG12D-LODER

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT01188785	<i>Phase I - Escalating Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Locally Advanced Adenocarcinoma of the Pancreas, and a Single Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Non-operable Adenocarcinoma of the Pancreas</i>	1	Complété	Cette étude a permis d'étudier l'innocuité du siG12D-LODER chez des patients atteints d'un adénocarcinome du pancréas. Le critère d'évaluation principal était d'évaluer l'efficacité du siG12D-LODER ainsi que sa distribution locale chez des patients non opérables grâce à des mesures histopathologiques et par analyse de l'ARN. De plus, la DLT a été définie.
NCT01676259	<i>Phase 2 Study Evaluating the Efficacy, Safety, Tolerability and PK of siG12D-LODER in the Treatment of Patients With Unresectable LAPC When Used in Conjunction With Standard Chemotherapy (Gemcitabine+Nab-Paclitaxel) Versus Chemotherapy Alone</i>	2	En cours de recrutement	Dans cette étude de phase II, une dose de 2,8 mg (8 X 0,35 mg de siG12D-LODER) sera administrée par cycles de 12 semaines et associée à un traitement de chimiothérapie chez des patients atteints d'un cancer pancréatique localement avancé non résectable. Le critère d'évaluation principal sera de déterminer la survie sans progression dans la population étudiée.

Analyse critique

Dès le départ, le siG12D-LODER a ciblé KRAS dans l'optique de proposer une stratégie médicamenteuse anticancéreuse. De nouveaux médicaments ciblant également cet oncogène sont maintenant testés et pourraient représenter de futurs concurrents au siG12D-LODER ^{322–324}. Le siG12D-LODER est le seul médicament à base d'ARNi qui assure une libération prolongée de siARN dans la région tumorale grâce au polymère biodégradable PLGA, approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour l'administration de médicaments ^{190,325,326}. Ce siARN représente une stratégie prometteuse contre les cancers du pancréas avancés. Il est en compétition avec l'Atu027 (qui vise une cible différente) et nécessite une dose administrée beaucoup plus faible (3 mg). Cependant, la formulation du LODER, c'est-à-dire la matrice de PLGA, augmentera le coût des médicaments ²⁷⁵. Par ailleurs, l'administration intratumorale présente des avantages et inconvénients. En effet, la biodisponibilité des molécules introduites grâce à cette méthode est relativement élevée par rapport aux autres voies d'administration. En outre, ce mode

d'administration est exempt d'effets indésirables liés à la perfusion habituellement rencontrés chez les patients traités par des siARN injectés en IV. Toutefois, les métastases des cellules pancréatiques ne seront pas contrôlées par le siG12D-LODER, sauf si celui-ci a été administré en association avec d'autres médicaments antinéoplasiques. La procédure d'administration du médicament dans les tumeurs pancréatiques nécessitera un service médical spécialisé. Cela implique des coûts et pourrait réduire par ailleurs le marché potentiel du siG12D-LODER. Comparativement, la voie IV est une procédure hospitalière plus accessible ²⁷⁵. En conclusion et en tenant compte du comportement agressif des cellules tumorales pancréatiques, le siG12D-LODER se présente comme une thérapie anticancéreuse prometteuse. Les résultats d'une phase 1 / 2a étaient positifs chez un nombre relativement faible de patients. On peut donc s'attendre à des résultats encourageants pour l'étude de phase 2 en cours qui teste le siG12D-LODER (2,8 mg) en association avec une chimiothérapie standard chez des patients atteints d'un cancer pancréatique avancé non résécable ²⁷⁵.

2.4. *Principal siARN testé contre certaines formes d'amylose : ALN-TTR02 (Patisiran)*

Mécanisme d'action

Le patisiran est un siARN ciblant l'ARNm de la transthyréine (*TTR*). Les mutations du gène *TTR* provoquent une maladie appelée amylose de la transthyréine (*ATTR*), caractérisée par une accumulation anormale de protéines amyloïdes insolubles dans les tissus, en particulier les nerfs périphériques et le cœur ³²⁷. Le pronostic pour les patients atteints d'une *ATTR* est faible. Les traitements actuels visent à réduire l'expression de la *TTR* mutée ou à stabiliser sa conformation. Cependant, ces médicaments ne sont pas efficaces chez tous les patients ³²⁸. La principale maladie visée par le patisiran est la neuropathie amyloïde familiale, maladie associée à des mutations de la *TTR*. Cette maladie neurologique est progressive, débilitante et irréversible ³²⁹. Le patisiran est un siARN antitranssthyréine puissant encapsulé dans des NP lipidiques, ciblant l'ARNm de la *TTR*. Les molécules de siARN du patisiran, précédemment développées par Tekmira, ont été formulées dans des particules lipidiques recouvertes de l'apolipoprotéine E. L'avantage de ce transporteur est qu'il

vectorise le patisiran jusqu'au foie, où la plupart des protéines TTR sont synthétisées²⁷⁵. Après injection IV, le vecteur est opsonisé, pénètre dans le foie et se lie aux récepteurs de l'ApoE présents en surface des hépatocytes. Au sein des cellules hépatiques, les siARN du patisiran vont réprimer l'expression de la TTR par le mécanisme post-transcriptionnel standard (Annexe 7)²⁷⁵.

Principaux essais cliniques avec le ALN-TTR02

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT01559077	<i>A Phase 1, Randomized, Single-blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Safety, Tolerability and Pharmacokinetics Study of ALN-TTR02 in Healthy Volunteers</i>	1	Complété	Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'innocuité, la tolérabilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie d'une dose unique d'ALN-TTR02 chez des sujets volontaires sains.
NCT01617967	<i>A Phase 2, Open-Label, Multi-Dose, Dose Escalation Trial to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Intravenous Infusions of ALN-TTR02 in Patients With TTR Amyloidosis</i>	2	Complété	Les objectifs de cette étude sont de déterminer l'innocuité, la tolérabilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de doses multiples d'ALN-TTR02 chez des patients atteints d'ATTR.
NCT01960348	<i>APOLLO: A Phase 3 Multicenter, Multinational, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Patisiran (ALN-TTR02) in Transthyretin (TTR)-Mediated Polyneuropathy (Familial Amyloidotic Polyneuropathy-FAP)</i>	3	Complété	Les objectifs de cette étude sont d'évaluer l'innocuité et l'efficacité du patisiran (ALN-TTR02) chez des patients atteints d'ATTR.
NCT01961921	<i>A Phase 2, Multicenter, Open-Label, Extension Study to Evaluate the Long-Term Safety, Clinical Activity, and Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Patients With Familial Amyloidotic Polyneuropathy Who Have Previously Received ALN-TTR02</i>	2	Complété	Les objectifs de cette étude sont d'évaluer l'innocuité et la tolérabilité de l'administration à long terme d'ALN-TTR02 (patisiran) chez des patients atteints d'ATTR.
NCT02510261	<i>A Multicenter, Open-Label, Extension Study to Evaluate the Long-term Safety and Efficacy of Patisiran in Patients With Familial Amyloidotic Polyneuropathy Who Have Completed a Prior Patisiran Clinical Study</i>	3	Inscription par invitation	Les objectifs de cette étude sont d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de l'administration à long terme d'ALN-TTR02 (patisiran) chez des patients atteints d'ATTR.

Analyse critique

Le patisiran est un excellent exemple de thérapie épigénétique. Ce siARN en formulation a été conçu pour traiter l'ATTR, une maladie génétique à fort besoin médical en raison de ses morbidité et mortalité significatives ³³⁰. La transplantation hépatique et les traitements par « stabilisateurs de la TTR », comme le tafamidis ou le diflunisal, sont d'autres options thérapeutiques ³³¹. Au lieu de cela, le patisiran utilise l'ARNi sur le gène TTR, contrôlant ainsi l'ATTR à une étape très fondamentale de sa pathogenèse. En effet, il agit directement sur l'ARNm transcrit à partir du gène responsable de l'amylose. L'extinction de la TTR atteint 80 %. Les patients traités ont montré une stabilisation de la progression de leur maladie ainsi qu'une amélioration de leur qualité de vie. Une partie de ce succès revient au vecteur qui permet une délivrance spécifique du patisiran dans les tissus hépatiques ²⁷⁵. Cependant, une assistance hospitalière pour les injections en IV et le besoin de médicaments pour contrôler les réactions liées aux perfusions sont des coûts supplémentaires à considérer. Aussi, le coût du patisiran pourrait être un problème car le traitement nécessiterait d'être mis en place sur la durée, atteignant ≈ 670 mg de siARN injecté au total (0,3 mg / kg, tous les trois semaines pendant 24 mois) ²⁷⁵. Le patisiran est le médicament à base de siARN qui est le plus avancé dans les différentes étapes de son développement. En effet, il a présenté des résultats encourageants au cours des essais de phase II. Deux études de phase III en cours confirmeront probablement l'innocuité et l'efficacité du patisiran chez des patients atteints d'ATTR, cette maladie génétique nécessitant de toute urgence de nouvelles options thérapeutiques ²⁷⁵.

3. Principaux miARN en course dans les essais cliniques

Des agents thérapeutiques, qui sont soit des inhibiteurs de miARN, soit des miARN mimétiques, sont apparus au cours des dernières années et entrent actuellement en essais cliniques (Figure 53). Ainsi, de nouvelles entreprises ont mis en place ces médicaments innovants pour des indications particulières. On retrouve notamment dans ces sociétés miRagen Therapeutics, Regulus Therapeutics et Mirna Therapeutics. Quelques exemples de ces agents thérapeutiques sont présentés en Annexe 1.

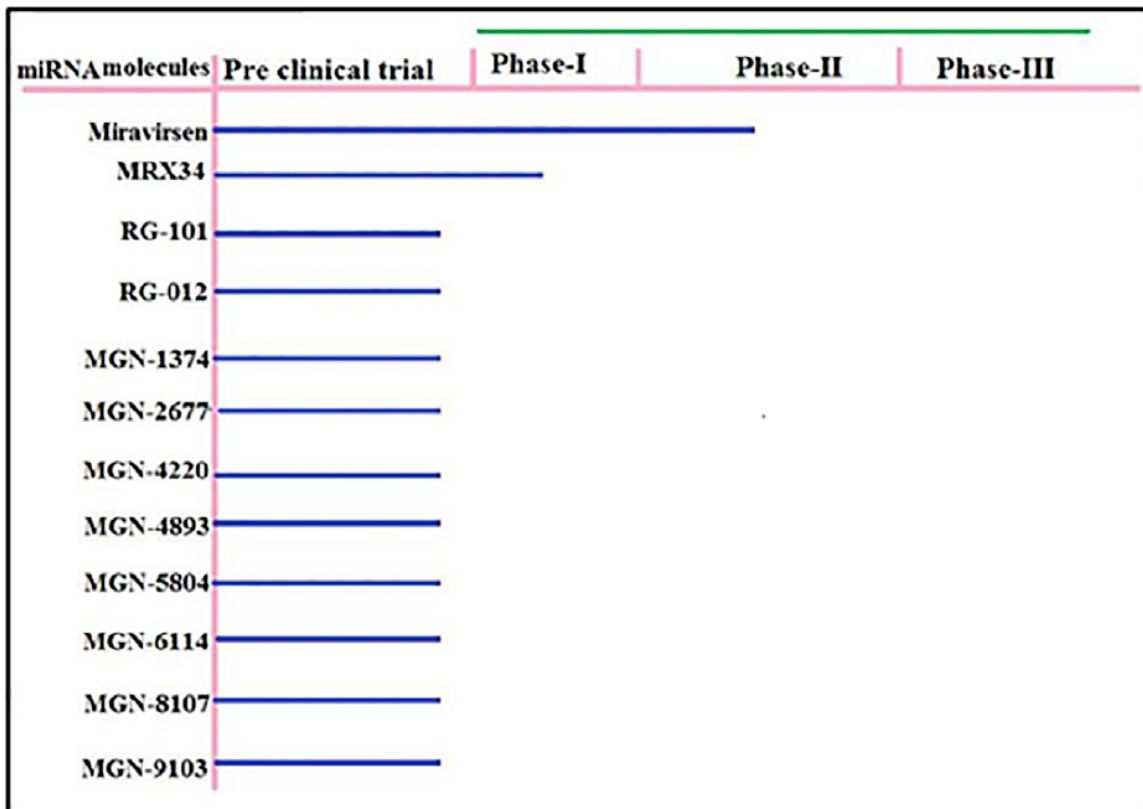


Figure 52 : différentes molécules de miARN testées en préclinique et dans des essais cliniques, avec leur état d'avancement ²⁶².

Mécanisme d'action

Le miravirsen (SPC3649) est un inhibiteur de miARN qui a été conçu pour traiter l'hépatite C ^{332,333}. Curieusement, un miARN produit par les cellules hépatiques, le microARN 122 (*miR-122*), est essentiel dans le processus d'infection du virus de l'hépatite C (VHC) (Annexe 9) ³³⁴. Un nouveau médicament antiviral agissant comme un inhibiteur du miR-122 (*AntimiR-122*) présente donc un potentiel thérapeutique contre cette maladie du foie ³³⁵. Le miravirsen est un oligonucléotide antisens de 15 bases. Il s'agit aussi d'un LNA phosphorothioaté et complémentaire de la région 5' du miR-122 mature. Les hétéroduplexes miravirsen-miR-122 nouvellement formés empêcheront la liaison du miR-122 à l'ARN viral, compromettant ainsi la réplication du VHC (Annexe 9) ³³².

Principaux essais cliniques avec le miravirsén

Identifiant ClinicalTrials.gov	Titre officiel	Phase	Statut du recrutement	Bref résumé
NCT00688012	<i>A Placebo-controlled, Double-blind, Randomized, Single Dose, Dose Escalating Trial in Healthy Men to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of SPC3649</i>	1	Complété	Un essai contrôlé par placebo, en double aveugle, randomisé, à dose unique et à doses croissantes chez des hommes en bonne santé afin d'évaluer l'innocuité, la tolérabilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du SPC3649.
NCT00979927	<i>A Placebo-controlled Double-blind, Randomised, Multiple Dose, Dose Escalating Study in Healthy Subjects to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of SPC3649</i>	1	Complété	Les objectifs de cette étude étaient d'étudier l'innocuité et la tolérabilité du SPC3649 administré en doses multiples à des volontaires sains.
NCT01200420	<i>A Phase 2a, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Ascending Multiple-Dose Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Antiviral Activity of SPC3649 (Miravirsén) Administered to Treatment-Naïve Subjects With Chronic Hepatitis C (CHC) Infection</i>	2	Complété	L'objectif principal de cette étude était de déterminer l'innocuité et la tolérabilité de doses multiples de miravirsén chez des sujets infectés par le VHC dans l'hépatite C chronique.
NCT01646489	<i>A Phase 1, Open-Label, Drug Interaction Study to Assess Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Co-Administered Miravirsén and Telaprevir in Healthy Subjects</i>	1	Complété	Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer l'innocuité, la tolérabilité et l'effet sur les taux sanguins du miravirsén et du télaprévir lorsqu'ils sont administrés ensembles.
NCT01727934	<i>A Phase 2, Open-Label, Clinical Trial of Miravirsén Sodium in Null Responder to Pegylated-Interferon Alpha Plus Ribavirin Subjects With Chronic Hepatitis C (CHC) Virus Genotype 1 Infection</i>	2	Inconnu	Les objectifs de cette étude sont d'évaluer l'innocuité, l'activité antivirale et la pharmacocinétique de 9 injections sous-cutanées de miravirsén en monothérapie sur un total de 12 semaines de traitement. Les sujets inclus dans cette étude sont infectés de manière chronique par le génotype 1 du VHC et sont des répondeurs nuls au traitement par thérapie combinée PEG-IFNα / RBV.
NCT01872936	<i>Phase 2, Open-Label, Clinical Trial of Miravirsén Sodium in Combination With Telaprevir and Ribavirin in Null Responders to Pegylated-Interferon Alpha Plus Ribavirin Subjects With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection</i>	2	Inconnu	Les objectifs de cette étude ouverte sont d'évaluer l'innocuité, la tolérabilité, l'activité antivirale, la résistance génotypique, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de 2 doses de miravirsén en association avec le télaprévir et la ribavirin chez des sujets infectés par le VHC de génotype 1 et qui sont des répondeurs nuls au traitement par thérapie combinée PEG-IFNα / RBV.

Analyse critique

Le miravirsén est le seul médicament présenté dans cette partie qui cible une séquence de miARN. La plupart des médicaments à base d'ARNi dans les essais cliniques sont des siARN (ne ciblant pas les miARN) car ils ont été les premiers utilisés pour le silençage génique et en thérapeutique expérimentale, peu après la découverte frappante du mécanisme de l'ARNi par Fire & Melo ^{336,337}. Les miARN constituent la deuxième, mais non moins importante, « vague de découverte » sur l'ARNi, car ils jouent un rôle dans de nombreuses maladies, y compris dans l'interaction virale hôte-pathogène ³³⁸. Le miravirsén est un inhibiteur du miR-122 anti-VHC qui peut être administré par injection sous-cutanée. Cette voie est adaptée aux maladies chroniques. Par exemple, elle est utilisée pour les injections d'insuline. Le taux d'absorption est constant et lent, fournissant un effet soutenu pour des injections hebdomadaires ³³⁹. En ce qui concerne sa structure, le miravirsén est un oligonucléotide d'ARN et d'ADN antisens simple brin, contenant des modifications chimiques améliorant sa stabilité et sa spécificité. Il est administré « nu », réduisant le coût de sa formulation. Cela relève d'une importance capitale, car les patients recevront de grandes quantités de miravirsén, soit ≈ 2400 mg ($7 \text{ mg / kg} \times 70 \text{ kg} \times 5$ injections hebdomadaires), ou même une dose plus élevée ²⁷⁵. En outre, d'autres médicaments antiviraux contre le VHC restent disponibles ³⁴⁰. Le miravirsén a montré une réduction dose-dépendante des taux de VHC. Les effets antiviraux de cet AntimiR-122 sont actuellement en cours d'évaluation dans des études de phase II chez des sujets atteints d'un VHC résistant aux interférons pégylés et aux antivirus classiques. Le miravirsén se présente donc comme une option supplémentaire proposée par Roche dans les traitements du VHC ²⁷⁵.

4. Conclusion

Les médicaments synthétiques basés sur l'ARNi ont démontré leur capacité à éteindre différents gènes, agissant dans des maladies à pathogenèses distinctes, allant de la mort cellulaire par apoptose à la prolifération cellulaire incontrôlée. Les indications pour ces agents thérapeutiques basés sur l'ARNi sont : 1- la mort des cellules rénales après lésions par ischémie, cisplatine ou transplantation (QPI-1002) ; 2- la croissance tumorale dans différents organes et la présence de métastases pulmonaires (TKM-080301, Atu027, siG12D-LODER) ; 3- infection par le génotype 1 du VHC dans l'hépatite C chronique (miravirsén) ; 4- les troubles ophtalmiques, y compris la DMLA, la NOIAN, le glaucome et les douleurs oculaires (PF-04523655, QPI-1007, SYL040012, SYL1001) ; 5- l'ATTR (patisiran) ²⁷⁵. Les essais cliniques ont démontré l'innocuité et la tolérance de ces produits. En effet, la plupart des effets indésirables étaient légers à modérés et se sont produits surtout lors de l'injection locale ou systémique du médicament. Les réactions associées à la perfusion après injections en IV sont transitoires et pourraient être évitées grâce à l'administration concomitante de glucocorticoïdes, d'antihistaminiques, ou bien de d'autres spécialités ²⁷⁵. En conclusion et selon toute vraisemblance, les médicaments thérapeutiques basés sur l'ARNi prendront place sur le marché pharmaceutique dans les prochaines années.

Conclusion générale

L'ARNi est une voie de régulation de l'expression des gènes dont la découverte récente en 1998 a révolutionné le monde de la génétique, de la biologie cellulaire et de la médecine. La communauté scientifique a en effet découvert que de petits ARN non codants, les siARN, les miARN et les piARN, jusque-là inconnus, participaient à la régulation post-transcriptionnelle, voire transcriptionnelle chez certaines espèces. Ainsi, ils pouvaient intervenir aussi bien dans l'expression de certains gènes que dans la protection du génome contre les effets néfastes des transposons. Mieux encore, l'introduction artificielle de petits ARN double-brin dans les cellules permet d'éteindre très spécifiquement l'expression d'un gène par une destruction massive et temporaire de ses ARNm. Cette destruction est basée sur l'homologie de séquence entre l'ARN interférent et le transcrit cible ¹.

Compte tenu du caractère avant tout naturel de ce mécanisme, l'extinction obtenue est très robuste et spécifique, ce qui fait de l'ARNi un système révolutionnaire pour étudier la fonction des gènes, valider de potentielles cibles thérapeutiques et même développer de nouvelles thérapeutiques ².

Cette nouvelle façon d'éteindre les gènes a ouvert la voie à des milliers d'études au cours desquelles l'expression de gènes impliqués dans des maladies humaines était supprimée par des ARN interférents. Malgré tout, un obstacle majeur à l'utilisation répandue de l'ARNi s'est présenté : disposer de techniques efficaces de délivrance de ces ARN. En effet, pour des applications thérapeutiques, des problèmes de stabilité, de biodistribution, de ciblage, de pénétration cellulaire, ou

d'induction d'éventuels effets secondaires, peuvent être rencontrés lorsque ces petits ARN sont administrés seuls ².

Tout cela implique d'avoir recours à des systèmes de délivrance adaptés. Ainsi, les efforts de recherche ont permis de développer des outils thérapeutiques viables. Les connaissances perpétuellement étoffées en nanotechnologies ont permis d'associer les ARN interférents à des molécules complexes afin de formuler des NP injectables pour la voie systémique. Les chefs de file de ces NP sont les liposomes et les NP polymériques ¹.

Dès 2004, les laboratoires pharmaceutiques se sont emparés de l'ARNi, bien conscients que celle-ci ferait partie de l'arsenal thérapeutique du futur. Différents essais cliniques ont vu le jour, ciblant des maladies variées et jusqu'alors très difficilement soignables. Les ARN interférents offrent en effet la possibilité de lutter contre n'importe quelle affection dont la pathogénie implique l'expression anormale d'une protéine. Ils offrent donc des solutions thérapeutiques à de nombreuses maladies, qu'elles soient virales, dégénératives, métaboliques, ou cancéreuses ¹. Aujourd'hui, des thérapeutiques pléthoriques basées sur l'ARNi sont à l'étude en phase clinique et pour lesquelles différents types de vecteurs de transfection peuvent ou non être utilisés. Les essais cliniques les plus avancés sont déjà en phase III. Une mise sur le marché des premiers médicaments à base de siARN peut être à prévoir prochainement.

L'ARNi n'a pas encore dévoilé tout son potentiel alors que le domaine des thérapies exploitant sa « force » est en plein mouvement. A l'avenir, il est certain que de nouvelles connaissances sur ses mécanismes seront acquises et de nouveaux médicaments développés afin de soigner des maladies actuellement incurables.

Annexes

Annexe 1 : essais cliniques enregistrés sur ClinicalTrials.gov testant ou ayant testés des thérapies basées sur l'ARNi.

Médicament	Type d'ARN interférent	Cible génétique/protéique	Système de délivrance	Voie d'administration	Indication	Phase, statut	ClinicalTrials.gov ID, année d'enregistrement, pays de conduite de l'étude	Promoteur
CANCERS								
ALN-VSP02	siARN	KSP et VEGF	SNALP	IV	Tumeurs solides avancées avec atteinte hépatique	I, complétés	NCT00882180/NCT01158079, 2009/2010, EU	Alnylam Pharma
Atu027	siARN	PKN3	Liposomes (AtuPLEX®)	IV	Tumeurs solides avancées ; Carcinome canalaire pancréatique	I, complété ; I/II, complété	NCT00938574, 2009, Allemagne ; NCT01808638, 2013, Allemagne	Silence Therapeutics GmbH
CALAA-01	siARN	RRM2	NP polymériques de ciblage	IV	Tumeurs solides	I, terminé	NCT00689065, 2008, EU	Calando Pharma
DCR-MYC (Dicer-substrate siRNA)	siARN	Oncogène MYC	NP lipidiques (EnCore)	IV	Tumeurs solides, myélome multiple, lymphomes non hodgkiniens ; Carcinome hépatocellulaire	I, terminé ; I/II, terminé	NCT02110563, 2014, EU ; NCT02314052, 2014, EU	Dicerna Pharma
siG12D-LODER	siARN	Oncogène KRAS muté	Support à base de polymères biodégradables	Implantation locale	Cancer du pancréas avancé	I, complété ; II, en cours	NCT01188785, 2010, EU ; NCT01676259, 2012, EU	Silenseed Ltd
siRNA-	siARN	EphA2	Liposomes	IV	Cancers avancés	I, en	NCT01591356, 2012, EU	M.D.

EphA2-DOPC			neutres			cours		Anderson Cancer Center
TKM-080301 (TKM-PLK1)	siARN	PLK1	SNALP	IV	Cancer du foie primaire ou secondaire ; Tumeurs neuroendocrines et carcinome corticosurrénalien	I, complété ; I/II, complété	NCT01437007, 2011, EU ; NCT01262235, 2010, EU	National Cancer Institute
MRX34 (miRNA-34a)	miARN	Diminue l'expression de > 30 oncogènes à travers de multiples voies oncogéniques, ainsi que des gènes impliqués dans l'évasion immunitaire tumorale	Liposomes (SMARTICLES)	IV	Cancer primitif du foie ou métastase hépatique d'autres cancers	I, terminé	NCT01829971, 2013, EU	Mirna Therapeutics, Inc.
TargomiRs (miRNA-16)	miARN	Restauration des niveaux de miARN pour inhiber la croissance tumorale = thérapie de remplacement des miARN	NP (minicellules bactériennes non vivantes)	IV	Mésothéliome pleural malin, Carcinome pulmonaire non à petites cellules	I, complété	NCT02369198, 2015, Australie	Asbestos Diseases Research Foundation
APN401	siARN	E3 ubiquitin ligase Cbl-b	Cellules mononucléaires	IV	Mélanome, cancer rénal ou pancréatique	I, complété	NCT02166255, 2014, EU	Comprehen sive Cancer Center of Wake Forest University
TKM-080301 (TKM-PLK1)	siARN	PLK1	SNALP	IV	Carcinome hépatocellulaire, Cancer du foie	I/II, complété	NCT02191878, 2014, EU	Arbutus Biopharma Corporation

MALADIES INFECTIEUSES								
ALN-VRS01	siARN	Nucléocapside du virus respiratoire syncytial (VRS)	siARN nus	Intranasal ; Nébulisation	Infection à VRS ; Infection à VRS chez les patients transplantés pulmonaires	II, complété ; II, complétés	NCT00496821, 2007, EU ; NCT00658086/NCT01065935, 2008/2010, EU	Alnylam Pharma
ARC-520	siARN	Régions conservées du VHB	DPC	IV	Infection chronique par le VHB	I, complété ; II, terminé ; II, retiré	NCT01872065, 2013, EU ; NCT02065336, 2014, EU ; NCT02349126, 2015, EU	Arrowhead Pharma
TKM-100201 ; TKM-100802	siARN	Ebola L polymérase, VP24 et VP35	NP lipidiques	IV	Infection par le virus Ebola	I, terminé ; I, terminé	NCT01518881, 2012, Canada ; NCT02041715, 2014, Canada	Arbutus Biopharma Corporation
Miravirsén (SPC3649 = AntimiR-122)	miARN	miR-122	AntimiR, oligodésoxynucléotide antisens, LNA, PS	Sous-cutanée	Infection par le virus de l'hépatite C	I, complété	NCT00979927, 2009, Pays-Bas	Santaris Pharma A/S
Miravirsén (SPC3649 = AntimiR-122)	miARN	miR-122	AntimiR, oligodésoxynucléotide antisens, LNA, PS	Sous-cutanée	Infection par le virus de l'hépatite C	I, complété	NCT00688012, 2008, Danemark	Santaris Pharma A/S
Miravirsén (SPC3649 = AntimiR-122)	miARN	miR-122	AntimiR, oligodésoxynucléotide antisens, LNA, PS	Sous-cutanée	Infection par le virus de l'hépatite C	II, complété	NCT01200420, 2010, EU	Santaris Pharma A/S
Miravirsén (SPC3649 = AntimiR-122)	miARN	miR-122	AntimiR, oligodésoxynucléotide antisens, LNA, PS	Sous-cutanée	Infection par le virus de l'hépatite C	II, status inconnu	NCT01727934, 2012, EU	Santaris Pharma A/S
Miravirsén (SPC3649 = AntimiR-122)	miARN	miR-122	AntimiR, oligodésoxynucléotide antisens, LNA, PS	Sous-cutanée	Infection par le virus de l'hépatite C	I, complété	NCT01646489, 2012, EU	Santaris Pharma A/S

			LNA, PS					
Miravirsén (SPC3649 = AntimiR-122)	miARN	miR-122	AntimiR, oligodésoxynucléotide antisens, LNA, PS	Sous-cutanée	Infection par le virus de l'hépatite C	II, status inconnu	NCT01872936, 2013, EU	Santaris Pharma A/S
MALADIES OCULAIRES								
AGN211745 (Sima-027)	siARN	VEGF receptor 1	siARN nus	IVT	Néovascularisation choroïdienne (NVC), Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge (DMLA)	I/II, complété ; II, terminé	NCT00363714, 2006, EU ; NCT00395057, 2006, EU	Allergan siRNA Therap. Inc.
Bamosiran (SYL040012)	siARN	ADRB2	siARN nus	Oculaire topique	Hypertension oculaire, glaucome	I, complété ; I/II, complété ; II, complété ; II, complété	NCT00990743, 2009, Espagne ; NCT01227291, 2010, Espagne ; NCT01739244, 2012, Espagne ; NCT02250612, 2014, Espagne	Sylentis, S.A.
Bevasiranib (Cand5)	siARN	VEGF	siARN nus	IVT	DMLA humide ; Œdème maculaire diabétique ; DMLA humide ; DMLA	II, complétés ; II, complété ; III, terminé ; III, retiré	NCT00722384/NCT0025975 3, 2004/2005, EU ; NCT00306904, 2006, EU ; NCT00499590, 2007, EU ; NCT00557791, 2007, EU	OPKO Health, Inc.
PF-04523655 (PF-655)	siARN	RTP801 (gène sensible au facteur 1 inductible par l'hypoxie)	siARN nus	IVT	DMLA ; NVC, rétinopathie diabétique, œdème maculaire diabétique ; Rétinopathie diabétique, complications diabétiques	I/II, complétés ; II, complété ; II, terminé	NCT00725686/NCT0071351 8, 2008/2008, Israël ; NCT01445899, 2011, Israël ; NCT00701181, 2008, Israël	Quark Pharma
QPI-1007	siARN	CASP2	siARN nus	IVT	Atrophie optique	I, complété	NCT01064505, 2010, EU	Quark Pharma

SYL1001	siARN	TRPV1	siARN nus	Oculaire topique	Douleur oculaire, syndrome de l'œil sec	I, complété ; I/II, complété	NCT01438281, 2011, Espagne ; NCT01776658, 2012, EU	Sylentis, S.A.
QPI-1007	siARN	CASP2	siARN nus	IVT	Glaucomes à angle fermé	II, complété	NCT01965106, 2013, EU	Quark Pharma
QPI-1007	siARN	CASP2	siARN nus	IVT	Neuropathie optique ischémique antérieure	II/III, en cours de recrutement	NCT02341560, 2015, EU	Quark Pharma
SYL1001	siARN	TRPV1	siARN nus	Oculaire topique	Syndrome de l'œil sec	II, complété	NCT02455999, 2015, Estonie	Sylentis, S.A.
MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET METABOLIQUES								
ALN-PCS02	siARN	PCSK9	NP lipidiques	IV	Hypercholestérolémie	I, complété	NCT01437059, 2011, EU	Alnylam Pharma
Inclisiran (ALN-PCSsc)	siARN	PCSK9	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Hypercholestérolémie	I, complété	NCT02314442, 2014, EU	Alnylam Pharma
PRO-040201 (TKM-ApoB)	siARN	ApoB	NP lipidiques	IV	Hypercholestérolémie	I, terminé	NCT00927459, 2009, EU	Arbutus Biopharma Corporation
TROUBLES GENETIQUES								
Fitusiran (ALN-AT3sc)	siARN	AT plasmatique	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Hémophilie A et B	I, complété	NCT02035605, 2014, EU	Alnylam Pharma
ALN-CC5	siARN	Composant C5 du complément	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Hémoglobinurie paroxystique nocturne	I/II, complété	NCT02352493, 2015, EU	Alnylam Pharma
ALN-TTR01	siARN	TTR	NP lipidiques	IV	Amylose de la transthyrétine	I, complété	NCT01148953, 2010, EU	Alnylam Pharma
Patisiran (ALN-TTR02)	siARN	TTR	NP lipidiques	IV	Amylose de la transthyrétine	I/II, complétés ; II/III, complétés	NCT01559077/NCT0161796 7/ NCT02053454, 2012/2012/2014, EU ; NCT01961921/NCT0196034 8, 2013/2013, EU	Alnylam Pharma
Revusiran (ALN-TTRsc)	siARN	TTR	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Amylose de la transthyrétine	II, complété ;	NCT01981837, 2013, EU ; NCT01814839/NCT0229218	Alnylam Pharma

						I/II/III, complétés	6/NCT02319005, 2013/2014/2014, EU	
TD101	siARN	Keratin 6a (N171k mutant)	siARN nus	Intradermique	Pachyonychie congénitale	I, complété	NCT00716014, 2008, EU	Pachyonyc hia congenita project
Lumasiran (ALN-GO1)	siARN	Glycolate oxidase	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Hyperoxalurie primitive type 1	II, inscription par invitation	NCT03350451, 2017, France	Alnylam Pharma
Lumasiran (ALN-GO1)	siARN	Glycolate oxidase	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Hyperoxalurie primitive type 1	I/II, en cours de recrutement	NCT02706886, 2016, EU	Alnylam Pharma
DCR-PH1	siARN	Glycolate oxidase	NP lipidiques	IV	Hyperoxalurie primitive type 1	I, terminé	NCT02795325, 2016, Allemagne	Dicerna Pharma
Patisiran (ALN-TTR02)	siARN	TTR	NP lipidiques	IV	Amylose de la transthyrétine	III, inscription par invitation	NCT02510261, 2015, EU	Alnylam Pharma
Fitusiran (ALN-AT3sc)	siARN	AT plasmatique	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Hémophilie A et B	I/II, pas encore de recrutement	NCT02554773, 2015, EU	Alnylam Pharma
Givosiran (ALN-AS1)	siARN	ALAS-1	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Porphyrie aiguë intermittente	I/II, pas encore de recrutement	NCT02949830, 2016, EU	Alnylam Pharma
AUTRES MALADIES								
ND-L02- s0201	siARN	HSP47	Liposomes couplés à la vitamine A	IV	Fibrose hépatique	I, complété ; I/II, complété	NCT01858935, 2013, EU ; NCT02227459, 2014, EU	Nitto Denko Corporation
QPI-1002 (I5NP)	siARN	p53	siARN nus	IV	Insuffisance rénale aiguë, Lésion rénale aiguë, Transplantation rénale	I, complété ; I, terminé ; I/II, complété	NCT00554359, 2007, EU ; NCT00683553, 2008, EU ; NCT00802347, 2008, Canada	Quark Pharma

BMT101	siARN	CTGF	cp-lasiRNAs	Intradermique	Cicatrices hypertrophiques	I, pas encore de recrutement	NCT03133130, 2017, Corée du Sud	Olix Pharma
Inclisiran (ALN-PCSSc)	siARN	PCSK9	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Insuffisance rénale	I, pas encore de recrutement	NCT03159416, 2017, Nouvelle-Zélande	The Medicines Company
Inclisiran (ALN-PCSSc)	siARN	PCSK9	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Hypercholestérolémie familiale homozygote	II, en cours de recrutement	NCT02963311, 2016, EU	The Medicines Company
Inclisiran (ALN-PCSSc)	siARN	PCSK9	Conjugaison GalNAc-siRNA	Sous-cutanée	Maladie cardiovasculaire athéroscléreuse, Athérosclérose symptomatique, Diabète de type 2, Hypercholestérolémie familiale	II, pas encore de recrutement	NCT03060577, 2017, EU	The Medicines Company
STP705	siARN	TGF-1 β et Cox-2	NP polymériques	Intradermique	Cicatrices hypertrophiques	I/II, en cours de recrutement	NCT02956317, 2016, EU	Sirnaomics, Inc.
QPI-1002 (I5NP)	siARN	p53	siARN nus	IV	Lésion rénale aiguë	II, pas encore de recrutement	NCT02610283, 2015, EU	Quark Pharma
QPI-1002 (I5NP)	siARN	p53	siARN nus	IV	Reprise retardée de la fonction du greffon chez les receveurs de greffe rénale	III, en cours de recrutement	NCT02610296, 2015, EU	Quark Pharma

ADRB, β -2 adrenergic receptor; ApoB, apolipoprotein B; AT, antithrombin; CASP2, Caspase-2; cp-lasiRNAs, cell-penetrating lasiRNAs; CTGF, connective tissue growth factor; DPC, dynamic polyconjugate; EphA2, ephrin type-A receptor 2; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamine; HSP47, heat shock protein 47; IV, intraveineuse; IVT, intravitréenne; KRAS, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; KSP, kinesin spindle protein; LNA, locked nucleic acid; miR-122, microRNA 122; MYC, v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PKN3, protein kinase N3; PLK1, polo-like-1; PS, phosphorothioated; RRM2, ribonucleotide reductase subunit M2; TRPV1, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1; TTR, Transthyretin; VEGF, vascular endothelial growth factor; VP, viral protein.

Annexe 2 : brevets à base de miARN et siARN ²⁶².

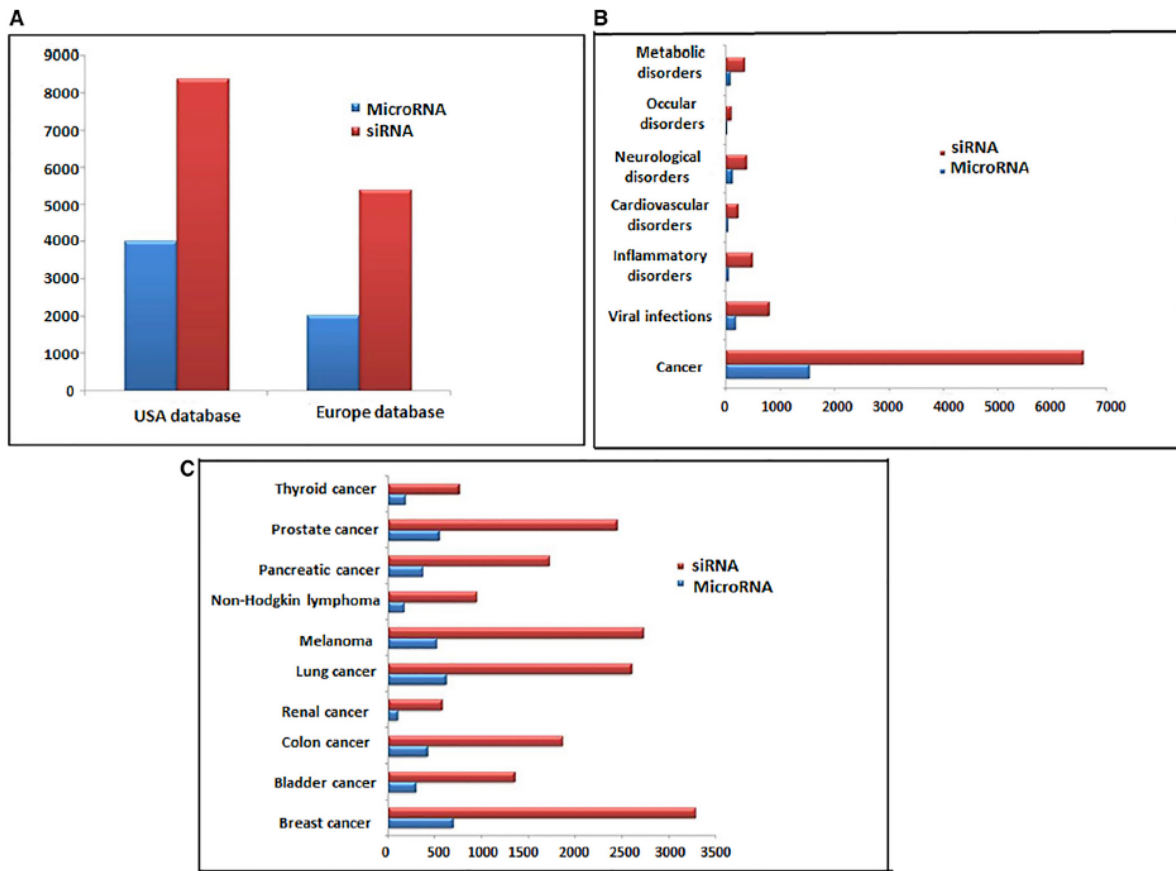


Figure 1. miRNA and siRNA Patents

(A) Total number of keyword searches ("microRNA" and "siRNA") performed in both the US patent search database and the European patent office database. (B) Number of patents in "microRNA" and "siRNA" in case of the different diseases. (C) Number of patents in "microRNA" and "siRNA" in event of the different type of cancers.

Annexe 3 : exemples de brevets délivrés relatifs aux miARN et siARN ²⁶².

Table 1. Some Relevant Issued Patents Related to MicroRNA and siRNA

Patent No.	Patent Type	Application No.	Publication Date	Content of the Patent Statement	Inventors	Applicant
CA2404890 C	USA	PCT/US2001/010188	November 19, 2013	RNA sequence-specific mediators of RNAi	Thomas Tuschl et al.	Whitehead Institute for Biomedical Research and seven more
EP 1309726 B1	European	EP20010922870	December 2, 2009	RNA sequence-specific mediators of RNAi	Thomas Tuschl et al.	Whitehead Institute for Biomedical Research and three more
EP1550719 B1	European	EP20050002454	December 24, 2008	double-stranded RNA (dsRNA) for inhibition of the expression of a defined gene	Roland Kreutzer and Stefan Limmer	Alnylam Europe AG
US7056704 B2	USA	US 10/832,432	June 6, 2006	RNAi mediating small RNA molecules	Thomas Tuschl et al.	Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der Wissenschaften E.V.
US7750144 B2	USA	US 10/912,440	July 6, 2010	mediates silencing of a target gene; lessening the base pair strength between the 5' end of the first strand and the 3' end of the second strand of the duplex as compared with the base pair strength	Phillip D. Zamore et al.	University of Massachusetts
EP1633890 B1	European	EP20040753972	October 20, 2010	methods and compositions for enhancing the efficacy and specificity of RNAi	Phillip D. Zamore et al.	University of Massachusetts
EP1309726 B1	European	EP20010922870	December 2, 2009	RNA sequence-specific mediators of RNAi	Thomas Tuschl et al.	Whitehead Institute for Biomedical Research and three more
US7825230 B2	USA	US 11/545,280	November 2, 2010	human microRNA targets in HIV genome and a method of identification thereof	Samir Kumar Brahmachari et al.	Council of Scientific & Industrial Research
US7683036 B2	USA	US 10/909,125	March 23, 2010	oligomeric compounds and compositions for use in modulation of small non-coding RNAs	Christine Esau et al.	Regulus Therapeutics
US7582744 B2	USA	US 11/200,703	September 1, 2009	chemically modified oligonucleotides	Muthiah Manoharan et al.	Alnylam Pharmaceuticals
US7592441 B2	USA	US 11/418,875	September 22, 2009	miRNA for diagnosis, prognosis, and treatment of liver cancer	Itzhak Bentwich et al.	Rosetta Genomics
US7642348 B2	USA	US 11/429,720	January 5, 2010	miRNA for diagnosis, prognosis, and treatment of prostate cancer; linear amplification and labeling for hybridization techniques like Luminex and microarray analysis	Itzhak Bentwich et al.	Rosetta Genomics
US7825229 B2	USA	US 11/418,870	November 2, 2010	miRNAs; diagnosis, prognosis, and treatments; drug screening; linear amplification and labeling for hybridization techniques like Luminex and microarray analysis; gene expression inhibition	Itzhak Bentwich et al.	Rosetta Genomics
US7635563 B2	USA	US 11/171,175	December 22, 2009	method for identifying miRNA expression (microarrays; RT-PCR)	H. Robert Horvitz et al.	Massachusetts Institute of Technology

Annexe 4 : structure schématique d'un duplex de siARN et modifications chimiques possibles au sein des oligonucléotides ²⁷⁵.

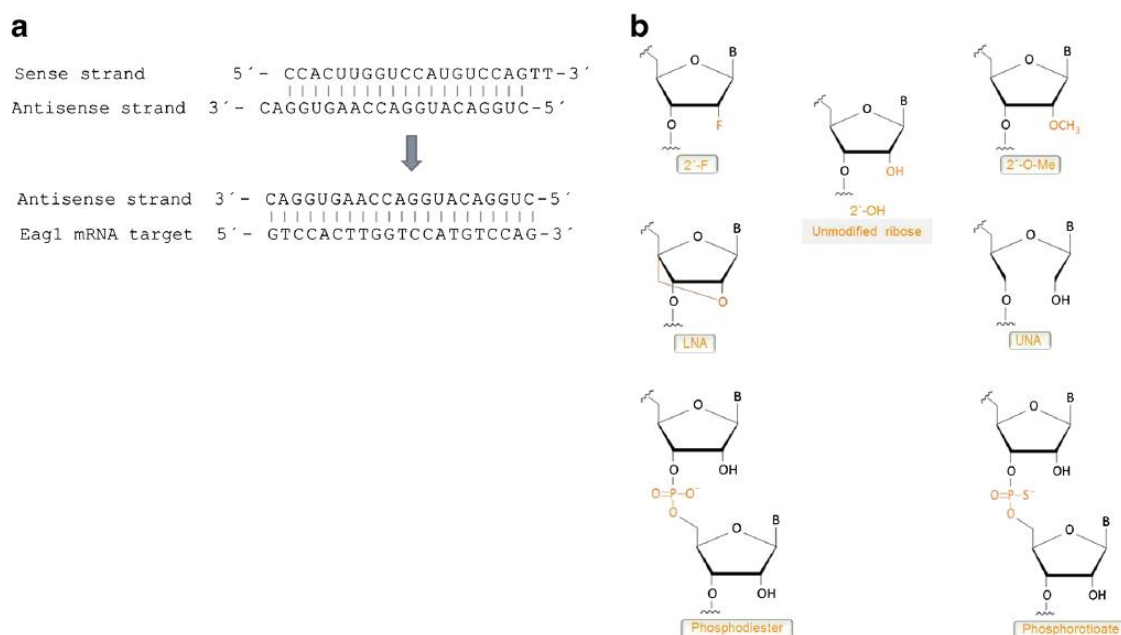


Fig. 2 Schematic structure of a siRNA duplex and chemical modifications in oligonucleotides. **(a)** A typical 21-mer siRNA with its annealed sense and antisense strands, and two overhangs nucleotides. RNA duplex is dismantled in cell cytoplasm by RISC complex, and the sense strand is eliminated. The antisense strand will guide the RISC complex to the target mRNA for cleavage. **(b)** Schematic changes in RNA-backbone. At the center, an unmodified ribose for comparisons. Letter B represents a nucleotide base. Ribose modifications ring include fluorine (2'-F), methoxy (2'-OMe), locked nucleic acids (LNA) and unlocked nucleic acids (UNA). Phosphodiester bond can be substituted by phosphorothioate. Chemical modifications of siRNA nucleotides improves nucleases resistance and reduces immunogenicity and off-target silencing, not affecting efficacy.

Annexe 5 : représentation du siARN QPI-1007 ainsi que de plusieurs de ses séquences cibles d'ARNm ²⁷⁵.

a
QPI-1007 molecular sequence



b

HUMAN CASPASE-2 mRNA sequence

```

1  agaggaagag aacuaauuaa ggagcgaaua cuacugguaa acuaauggaa gaaaucugcu gcaccacugg auauugggag uguguggcau gcauccuau
101 caucaggaaa cucuaaaaaa gaaccgagug gugcuagcca aacagcuguu guugagcgaa uuguuagaac aucuucugga gaaggacauc aucaccuugg
      QPI-1007 guide strand 3'- c ggucuuacac cuugagga - 5'
201 aaugagggga gcucauccag gccaaagugg gcaguucag ccagaauug gaaacuccu acuugcugcc uaagaggggu cccaagcuu uugaugccut
(...)

RAT CASPASE-2 mRNA sequence
1  cuggaaaugg cggcgucgag cgggaggucu cagucuuccc ugcacaggaa ggggcugaug gcggcugaca ggaggagcag gaaauuggca gugugggaa
101 ugcauccuga ccaucaggaa acucugaaaa agaaucgagu ggugcuggcc aaacagcugc ugcugagcga acuguuagaa caucuccuag aaaaggacau
      QPI-1007 guide strand 3'- cggucuuaca ccuugagga - 5'
201 uaucacuug gaaauaggg agcuaucca ggccaaagg ggaguuuca gccagaauu ggaacuccu aaccugcugc caaagagagg accccaggcu
(...)
  
```

Fig. 3 QPI-1007 and mRNA target sequences. **(a)** A schematic representation of QPI-1007 duplex. Passenger (5'→3') and guide (3'→5'). Uppercase letters represent unmodified nucleotides. Chemical changes are: (i) 2'-O-methyl sugar modified RNA nucleosides, represented by lowercase letters; (ii) L-DNA cytidine nucleotide, represented by Y; (iii) inverted deoxybasic moiety, represented by ia. **(b)** Complementarity between QPI-1007 guide strand and the human and rat caspase-2 mRNAs NCBI reference sequences, NM_001224.4 and NM_022522.2, respectively. Target sequences for QPI-1007 in caspase-2 mRNA are represented in red (5'→3'), while QPI-1007 guide strands are written in orange (3'→5'). QPI-1007 molecular sequence was previously published.

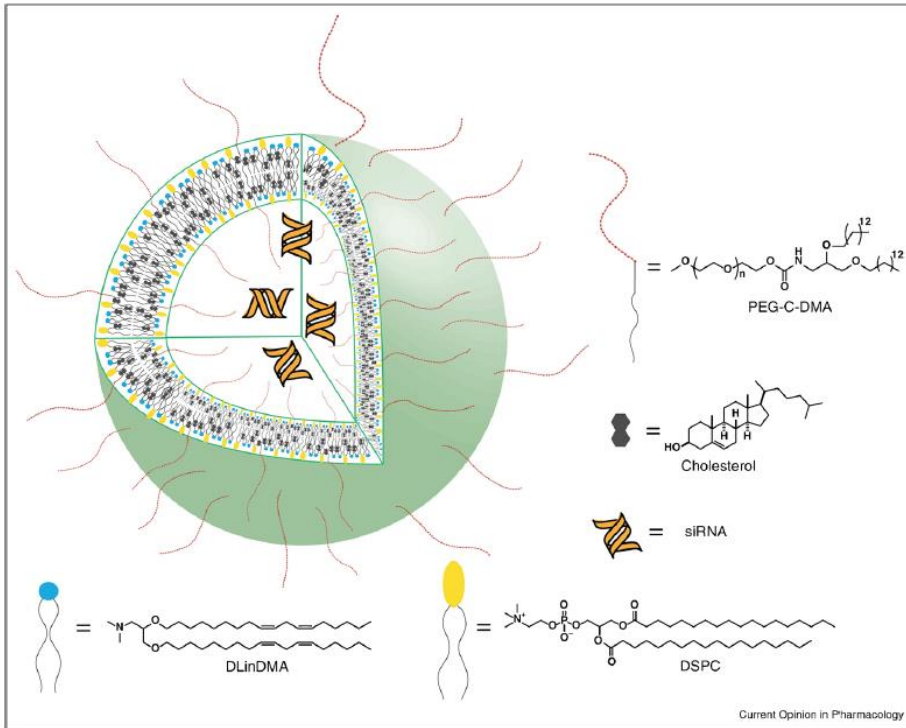


Fig. 4 Schematic representation of a stable-nucleic-acid-lipid particle (SNALP). These particles of < 200 nm in size have provided an efficient delivery system for siRNAs administered by intravenous route. SNALPs resemble the well-known liposomes, as they are vesicles with an outer lipid bilayer enclosing a water compartment inside. SNALPs present some valuable improvements for in vivo studies. Negatively-charged siRNA molecules (the small double-stranded structures, in orange) are incorporated into the aqueous inner part with the help of cationic lipids (1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropane, DlinDMA). Helper lipids with a yellow head (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) promote the release of siRNAs from SNALPs in cell cytoplasm. Polyethylene glycosylated lipids (PEG-C-DMA) offers an external surface more hydrophilic and neutral, for stability and crossing barriers. Cholesterol helps to stabilize the lipid particle formulation. Reprinted with permission from Reference (56). Copyright (2012), Elsevier. DSPC 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PEG-C-DMA Polyethylene glycosylated lipids, PEG-C-DMA Polyethylene glycosylated lipids.

Annexe 7 : rationnel de la technologie du patisiran pour le traitement de l'amylose de la transthyréine²⁷⁵.

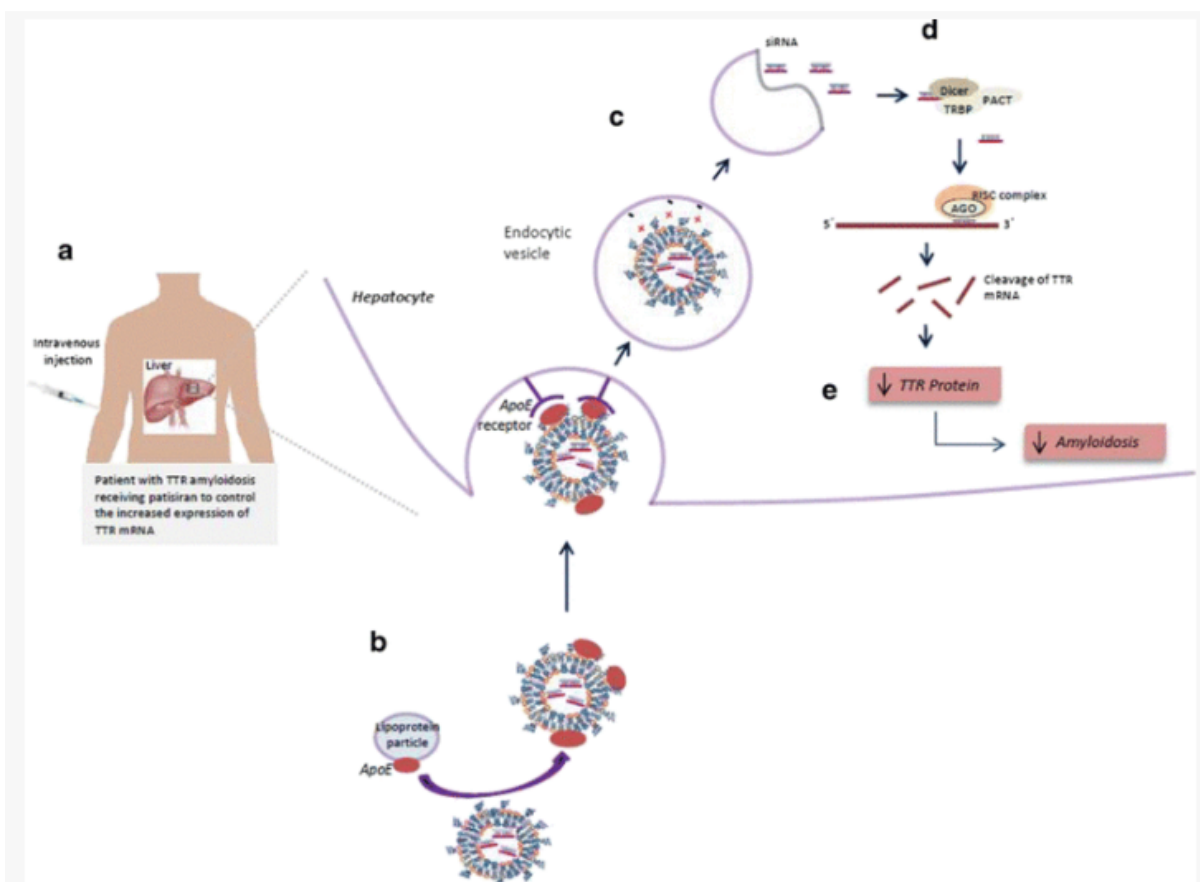


Fig. 5.

Rationale on patisiran technology for the treatment of TTR-mediated amyloidosis. (a) Patients with amyloidosis present an increased expression of TTR gene. Patisiran is a TTR-targeted siRNA, formulated in lipid carriers for I.V. administration. (b) Lipid particles coated with ApoE bind to receptors in hepatic cells and are internalized by endocytosis. (c) Ionizable lipids of these particles will acquire positive charges by protonation due to the acid pH of endocytic vesicles. Positively charged nanoparticles will bind to negatively charged endosomal membrane, and the fusion of these membranes will finally deliver siRNAs in cell cytoplasm. (d) TTR-targeted siRNAs will bind to complementary sequences in 3' end of TTR mRNA, instead of the traditional CDS region. AGO enzyme of RISC complex will execute TTR mRNA cleavage. (e) Reducing TTR expression will prevent the accumulation of abnormal amyloid proteins in tissues. AGO – Argonaute 2; ApoE – apolipoprotein E; CDS – Coding sequence region of mRNA; Dicer – a ribonuclease enzyme; PACT – Protein activator of the interferon-induced protein kinase (PKR); RISC – RNA-induced silencing complex; TRBP – HIV-1 Trans-activation response (TAR) RNA-binding protein; TTR – transthyretin.

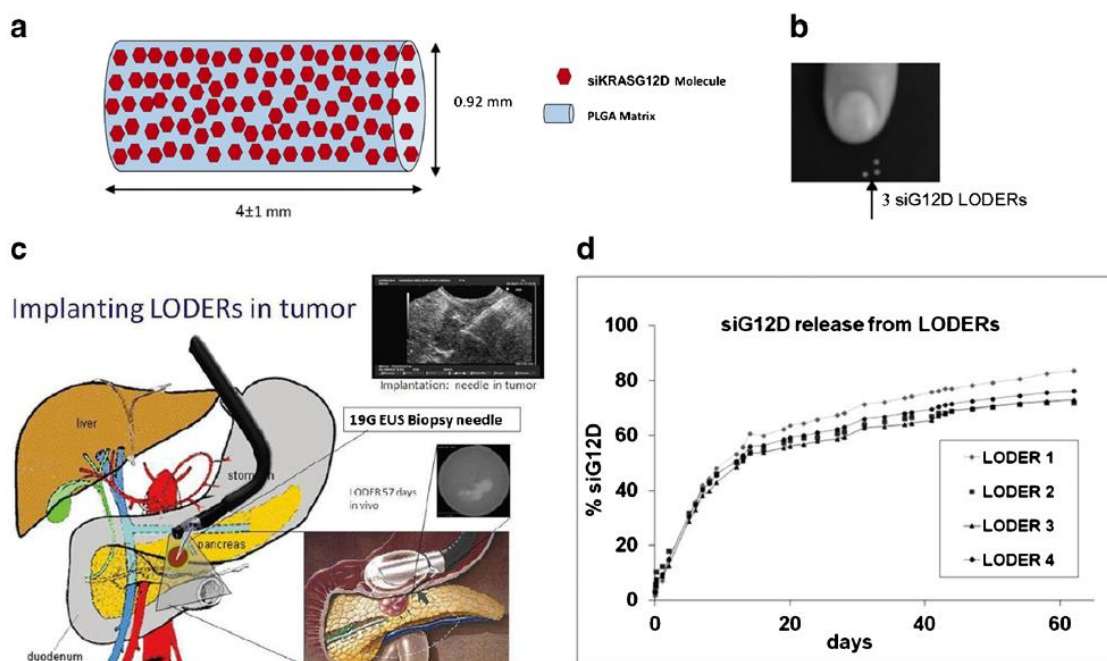


Fig. 6 Characterization of siG12D-LODER devices and injection procedure (a) Schematic representation of the siG12D-LODER matrix of PLGA. (b) The picture is showing the millimetric dimension of siG12D-LODER devices. (c) Standard procedure EUS guidance for implanting devices into pancreatic tumor. (d) Sustained release of siRNAs (10 µg) from the PLGA matrix over two months. Devices were incubated in PBS (pH = 7.4), at 37 °C. Reprinted with permission from References (109, 112). KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS-target siRNA siRNA designed to silence mutated KRAS, PLGA matrix polymeric matrix of poly(lactic-co-glycolic) acid.

Annexe 9 : le rôle du miR-122 dans le processus d'infection du VHC et l'action antivirale du miravirsén²⁷⁵.

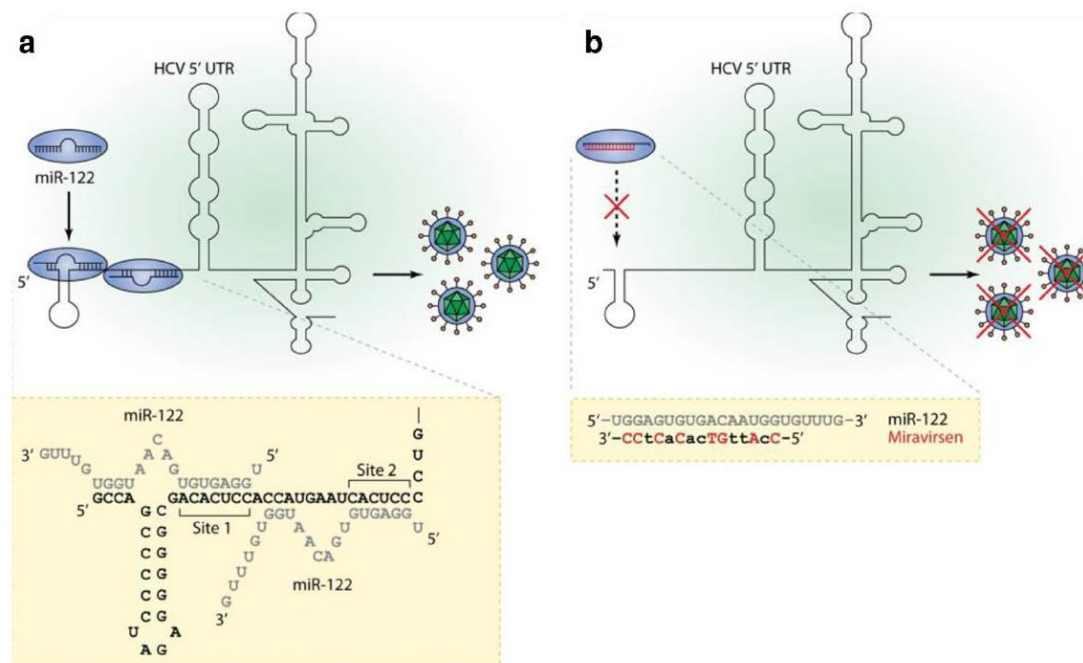


Fig. 7 The role of miR-122 in HCV infection and antiviral action of miravirsén. **(a)** miR-122 expressed by hepatic cells is an essential host factor for HCV infection, as it guides AGO2 protein to 5'-UTR region of the virus genome. The binding of Ago2-miR-122 complex to 5'-UTR region protects viral RNA from nucleolytic degradation, allowing virus propagation in patients with hepatitis C. **(b)** Miravirsén is an antisense oligo (AntimiR) that binds to and inhibits miR-122 function, thereby counteracting HCV infection. Chemical changes in miravirsén structure are LNA (red uppercase) and the inclusion of DNA nucleotides (lowercase). Reprinted with permission from Reference (119).

Bibliographie

1. Husson, J.-C. L'ARN interférence: des mécanismes fondamentaux aux applications thérapeutiques. (École nationale vétérinaire d'Alfort, 2011).
2. Creusat, G. L'ARN interférence, l'émergence d'une nouvelle stratégie thérapeutique. (Université de Nancy I. UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques, 2009).
3. Rossbach, M. Small non-coding RNAs as novel therapeutics. *Curr. Mol. Med.* **10**, 361–368 (2010).
4. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003).
5. Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A. & Benoit, J.-P. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* **29**, 3477–3496 (2008).
6. Bas, A. & Germe, R. *Nouvelle stratégie thérapeutique contre les cancers associés au virus d'Epstein-Barr: étude in vitro de l'inhibition du cycle lytique du virus par ARN interférence.* (2007).
7. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289 (1990).
8. Cogoni, C. & Macino, G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 638–643 (2000).
9. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
10. Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
11. Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat. Biotechnol.* **18**, 896–898 (2000).
12. Hamelin, B. Intérêts des ARN interférents comme outils thérapeutiques dans le traitement des cancers. (Université de Caen Normandie, 2017).

13. Piatek, M. J. & Werner, A. Endogenous siRNAs: regulators of internal affairs. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1174–1179 (2014).
14. 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. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 10268–10295 (2012).
15. Connerty, P., Ahadi, A. & Hutvagner, G. RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2015).
16. Daniels, S. M. & Gatignol, A. The multiple functions of TRBP, at the hub of cell responses to viruses, stress, and cancer. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **76**, 652–666 (2012).
17. Jinek, M. & Doudna, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**, 405–412 (2009).
18. Wilson, R. C. & Doudna, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 217–239 (2013).
19. 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* **75**, 843–854 (1993).
20. Pasquinelli, A. E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86–89 (2000).
21. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **87**, 3–14 (2015).
22. Tanzer, A. & Stadler, P. F. Evolution of microRNAs. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **342**, 335–350 (2006).
23. Fazi, F. & Nervi, C. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc. Res.* **79**, 553–561 (2008).
24. Nguyen, T. A. *et al.* Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* **161**, 1374–1387 (2015).
25. Makarova, J. A. *et al.* Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog. Histochem. Cytochem.* **51**, 33–49 (2016).
26. Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379 (2010).
27. Voigt, F. *et al.* Crystal structure of the primary piRNA biogenesis factor Zucchini reveals similarity to the bacterial PLD endonuclease Nuc. *RNA N. Y. N* **18**, 2128–2134 (2012).

28. Brennecke, J. *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**, 1089–1103 (2007).
29. Stein, C. A. Antisense that comes naturally. *Nat. Biotechnol.* **19**, 737–738 (2001).
30. Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E. & Prydz, H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1757–1766 (2002).
31. Gredell, J. A., Dittmer, M. J., Wu, M., Chan, C. & Walton, S. P. Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry* **49**, 3148–3155 (2010).
32. Reynolds, A. *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**, 326–330 (2004).
33. Ichihara, M. *et al.* Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res.* **35**, e123 (2007).
34. Huesken, D. *et al.* Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* **23**, 995–1001 (2005).
35. Baranova, A., Bode, J., Manyam, G. & Emelianenko, M. An efficient algorithm for systematic analysis of nucleotide strings suitable for siRNA design. *BMC Res. Notes* **4**, 168 (2011).
36. Kurreck, J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **48**, 1378–1398 (2009).
37. Hong, J. *et al.* Focusing on RISC assembly in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 703–708 (2008).
38. Patzel, V. *et al.* Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1440–1444 (2005).
39. Kim, D.-H. *et al.* Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* **23**, 222–226 (2005).
40. Siolas, D. *et al.* Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat. Biotechnol.* **23**, 227–231 (2005).
41. Krueger, U. *et al.* Insights into Effective RNAi Gained from Large-Scale siRNA Validation Screening. *Oligonucleotides* **17**, 237–250 (2007).
42. Kretschmer-Kazemi Far, R. & Sczakiel, G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4417–4424 (2003).

43. Overhoff, M. *et al.* Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: A Systematic Global Analysis. *J. Mol. Biol.* **348**, 871–881 (2005).
44. Schubert, S., Grünweller, A., Erdmann, V. A. & Kurreck, J. Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: Systematic Analysis of Intentionally Designed Binding Regions. *J. Mol. Biol.* **348**, 883–893 (2005).
45. Shao, Y. *et al.* Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *RNA* **13**, 1631–1640 (2007).
46. Westerhout, E. M. & Berkhout, B. A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4322–4330 (2007).
47. Ding, Y., Chan, C. Y. & Lawrence, C. E. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **32**, W135–W141 (2004).
48. Kanellopoulou, C. *et al.* Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* **19**, 489–501 (2005).
49. Bruniaux, J. Développement de nanoparticules lipidiques pour la délivrance de courtes séquences d'ARN interférents. (Université de Grenoble, 2014).
50. Murchison, E. P., Partridge, J. F., Tam, O. H., Cheloufi, S. & Hannon, G. J. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12135–12140 (2005).
51. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–655 (2009).
52. Parker, J. S. How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence* **1**, 3 (2010).
53. Orban, T. I. & Izaurralde, E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA N. Y. N* **11**, 459–469 (2005).
54. Peng, J. *et al.* Hyperglycemia, p53, and mitochondrial pathway of apoptosis are involved in the susceptibility of diabetic models to ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* **87**, 137–150 (2015).
55. Ayers, M., Fargnoli, J., Lewin, A., Wu, Q. & Platero, J. S. Discovery and validation of biomarkers that respond to treatment with brivanib alaninate, a small-molecule VEGFR-2/FGFR-1 antagonist. *Cancer Res.* **67**, 6899–6906 (2007).
56. Iorns, E., Lord, C. J., Turner, N. & Ashworth, A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 556–568 (2007).

57. Kovar, H. Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 189–196 (2005).
58. Stegmaier, K. *et al.* Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. *PLoS Med.* **4**, e122 (2007).
59. Devi, G. R. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* **13**, 819–829 (2006).
60. Weiler, J., Hunziker, J. & Hall, J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther.* **13**, 496–502 (2006).
61. Torrance, C. J., Agrawal, V., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Use of isogenic human cancer cells for high-throughput screening and drug discovery. *Nat. Biotechnol.* **19**, 940–945 (2001).
62. Kohli, M., Rago, C., Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses. *Nucleic Acids Res.* **32**, e3 (2004).
63. Zuber, J. *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* **478**, 524–528 (2011).
64. Wall, N. R. & Shi, Y. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet Lond. Engl.* **362**, 1401–1403 (2003).
65. Leung, R. K. M. & Whittaker, P. A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **107**, 222–239 (2005).
66. Gitlin, L. & Andino, R. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J. Virol.* **77**, 7159–7165 (2003).
67. Radhakrishnan, S. K., Layden, T. J. & Gartel, A. L. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology* **323**, 173–181 (2004).
68. Giladi, H. *et al.* Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **8**, 769–776 (2003).
69. Tompkins, S. M., Lo, C.-Y., Tumpey, T. M. & Epstein, S. L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8682–8686 (2004).
70. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.* **11**, 50–55 (2005).

71. Little, S. J. *et al.* Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* **347**, 385–394 (2002).
72. Kitabwalla, M. & Ruprecht, R. M. RNA interference--a new weapon against HIV and beyond. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1364–1367 (2002).
73. Agrawal, N. *et al.* RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **67**, 657–685 (2003).
74. Friedrich, I., Shir, A., Klein, S. & Levitzki, A. RNA molecules as anti-cancer agents. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 223–230 (2004).
75. Duxbury, M. S. *et al.* Systemic siRNA-mediated gene silencing: a new approach to targeted therapy of cancer. *Ann. Surg.* **240**, 667–674; discussion 675-676 (2004).
76. Shankar, P., Manjunath, N. & Lieberman, J. The prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA* **293**, 1367–1373 (2005).
77. de Fougères, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J. & Lieberman, J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 443–453 (2007).
78. Zhou, Y., Zhang, C. & Liang, W. Development of RNAi technology for targeted therapy--a track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **193**, 270–281 (2014).
79. Layzer, J. M. *et al.* In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA N. Y. N* **10**, 766–771 (2004).
80. Whitehead, K. A., Langer, R. & Anderson, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 129–138 (2009).
81. Fattal, E. & Bochot, A. Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1203–1223 (2006).
82. de Fougères, A. & Novobrantseva, T. siRNA and the lung: research tool or therapeutic drug? *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 280–285 (2008).
83. Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J. & Anderson, D. G. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **20**, 513–524 (2012).
84. Santel, A. *et al.* A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther.* **13**, 1222–1234 (2006).

85. Dykxhoorn, D. M. & Lieberman, J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu. Rev. Med.* **56**, 401–423 (2005).
86. Juliano, R. L., Alahari, S., Yoo, H., Kole, R. & Cho, M. Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm. Res.* **16**, 494–502 (1999).
87. Robertson, D. Crohn's trial shows the pros of antisense. *Nat. Biotechnol.* **15**, 209 (1997).
88. Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622–632 (2007).
89. Luzio, J. P. *et al.* Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 9)**, 1515–1524 (2000).
90. Luzio, J. P. *et al.* Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol. Membr. Biol.* **20**, 141–154 (2003).
91. Xu, Y. & Szoka, F. C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **35**, 5616–5623 (1996).
92. Hafez, I. M., Maurer, N. & Cullis, P. R. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* **8**, 1188–1196 (2001).
93. Akita, H. *et al.* Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: programmed endosomal escape and dissociation. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **143**, 311–317 (2010).
94. Tseng, Y.-C., Mozumdar, S. & Huang, L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 721–731 (2009).
95. Sonawane, N. D., Szoka, F. C. & Verkman, A. S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 44826–44831 (2003).
96. Xia, W. *et al.* Bioreducible PEI-siRNA Nanocomplex for Liver Cancer Therapy: Transfection, Biodistribution, and Tumor Growth Inhibition *In Vivo*. *J. Nanomater.* **2013**, 1–11 (2013).
97. Kim, D. H. & Rossi, J. J. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 173–184 (2007).
98. Guo, P. *et al.* Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 650–666 (2010).

99. Kim, D.-H. *et al.* Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* **23**, 222–226 (2005).
100. Hornung, V. *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263–270 (2005).
101. Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C. H. & MacLachlan, I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **13**, 494–505 (2006).
102. Jackson, A. L. *et al.* Position-specific chemical modification of siRNAs reduces ‘off-target’ transcript silencing. *RNA N. Y. N* **12**, 1197–1205 (2006).
103. Lin, X. *et al.* siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4527–4535 (2005).
104. Jackson, A. L. & Linsley, P. S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 57–67 (2010).
105. Jackson, A. L. *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635–637 (2003).
106. Jackson, A. L. *et al.* Widespread siRNA ‘off-target’ transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA N. Y. N* **12**, 1179–1187 (2006).
107. Potter, H. & Heller, R. Transfection by electroporation. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 9**, Unit9.3 (2010).
108. Balakrishnan, S., Sadasivam, M., Kannan, A., Panneerselvam, A. & Prahalathan, C. Glucose modulates Pax6 expression through the JNK/p38 MAP kinase pathway in pancreatic beta-cells. *Life Sci.* **109**, 1–7 (2014).
109. Jensen, K., Anderson, J. A. & Glass, E. J. Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **158**, 224–232 (2014).
110. Deng, C. X., Sieling, F., Pan, H. & Cui, J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med. Biol.* **30**, 519–526 (2004).
111. Fan, Z., Liu, H., Mayer, M. & Deng, C. X. Spatiotemporally controlled single cell sonoporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16486–16491 (2012).

112. Inoue, H. *et al.* Sonoporation-mediated transduction of siRNA ameliorated experimental arthritis using 3 MHz pulsed ultrasound. *Ultrasonics* **54**, 874–881 (2014).
113. Kinoshita, M. & Hynynen, K. A novel method for the intracellular delivery of siRNA using microbubble-enhanced focused ultrasound. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 393–399 (2005).
114. Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A. & Herweijer, H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat. Genet.* **32**, 107–108 (2002).
115. Lewis, D. L. & Wolff, J. A. Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 115–123 (2007).
116. Wilcox, D. M. *et al.* Delivery of RNAi reagents in murine models of obesity and diabetes. *J. RNAi Gene Silenc. Int. J. RNA Gene Target. Res.* **3**, 225–236 (2006).
117. Kikkert, J. R., Vidal, J. R. & Reisch, B. I. Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **286**, 61–78 (2005).
118. Svarovsky, S., Borovkov, A. & Sykes, K. Cationic gold microparticles for biolistic delivery of nucleic acids. *BioTechniques* **45**, 535–540 (2008).
119. O'Brien, J. A., Holt, M., Whiteside, G., Lummis, S. C. & Hastings, M. H. Modifications to the hand-held Gene Gun: improvements for in vitro biolistic transfection of organotypic neuronal tissue. *J. Neurosci. Methods* **112**, 57–64 (2001).
120. O'Brien, J. A. & Lummis, S. C. R. Nano-biolistics: a method of biolistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles. *BMC Biotechnol.* **11**, 66 (2011).
121. Usui, I., Imamura, T., Huang, J., Satoh, H. & Olefsky, J. M. Cdc42 is a Rho GTPase family member that can mediate insulin signaling to glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 13765–13774 (2003).
122. Choung, S., Kim, Y. J., Kim, S., Park, H.-O. & Choi, Y.-C. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 919–927 (2006).
123. Hall, A. H. S., Wan, J., Shaughnessy, E. E., Ramsay Shaw, B. & Alexander, K. A. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5991–6000 (2004).

124. Stessl, M. *et al.* A proteomic study reveals unspecific apoptosis induction and reduction of glycolytic enzymes by the phosphorothioate antisense oligonucleotide oblimersen in human melanoma cells. *J. Proteomics* **72**, 1019–1030 (2009).
125. De Paula, D., Bentley, M. V. L. B. & Mahato, R. I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. *RNA N. Y. N* **13**, 431–456 (2007).
126. Chen, P. Y. *et al.* Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA N. Y. N* **14**, 263–274 (2008).
127. Robbins, M. *et al.* 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **15**, 1663–1669 (2007).
128. Mook, O. R., Baas, F., de Wissel, M. B. & Fluiter, K. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 833–843 (2007).
129. Parrish, J. Z. & Xue, D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol. Cell* **11**, 987–996 (2003).
130. Soutschek, J. *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**, 173–178 (2004).
131. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P. D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* **10**, 537–548 (2002).
132. Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.-P. & Unverzagt, C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 4975–4977 (2004).
133. Gao, S. *et al.* The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **17**, 1225–1233 (2009).
134. Wolfrum, C. *et al.* Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1149–1157 (2007).
135. Nishina, K. *et al.* Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **16**, 734–740 (2008).
136. Manjunath, N. & Dykxhoorn, D. M. Advances in synthetic siRNA delivery. *Discov. Med.* **9**, 418–430 (2010).
137. McNamara, J. O. *et al.* Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1005–1015 (2006).

138. Muratovska, A. & Eccles, M. R. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* **558**, 63–68 (2004).
139. Elmén, J. *et al.* Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* **33**, 439–447 (2005).
140. Bramsen, J. B. *et al.* A screen of chemical modifications identifies position-specific modification by UNA to most potently reduce siRNA off-target effects. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5761–5773 (2010).
141. Griveau, A. *et al.* Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *Int. J. Pharm.* **454**, 765–774 (2013).
142. ISO/TS 80004-2:2015(en), Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects. Available at: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:en:fr>. (Accessed: 15th March 2018)
143. Somia, N. & Verma, I. M. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 91–99 (2000).
144. Dupuy, N. Composes amphiphiles modulables hautement fluorés: synthèse et applications dans le domaine de la vectorisation. (Université de Nancy I, 2010).
145. Dallas, A. & Vlassov, A. V. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **12**, RA67-74 (2006).
146. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003).
147. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**, 243–247 (2002).
148. Anson, D. S. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet. Vaccines Ther.* **2**, 9 (2004).
149. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255–256 (2003).
150. Li, C. X. *et al.* Delivery of RNA interference. *Cell Cycle Georget. Tex* **5**, 2103–2109 (2006).

151. Bahi, A., Boyer, F., Kolira, M. & Dreyer, J.-L. In vivo gene silencing of CD81 by lentiviral expression of small interference RNAs suppresses cocaine-induced behaviour. *J. Neurochem.* **92**, 1243–1255 (2005).
152. Dittgen, T. *et al.* Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 18206–18211 (2004).
153. Singer, O. *et al.* Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Neurosci.* **8**, 1343–1349 (2005).
154. Relph, K. L., Harrington, K. J. & Pandha, H. Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer. *Semin. Oncol.* **32**, 573–582 (2005).
155. Xia, H., Mao, Q., Paulson, H. L. & Davidson, B. L. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1006–1010 (2002).
156. Gurzov, E. N. & Izquierdo, M. RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth in vivo. *Gene Ther.* **13**, 1–7 (2006).
157. Li, H. *et al.* Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **128**, 2029–2041 (2005).
158. Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Horio, Y. & Takahashi, T. ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Res.* **65**, 10680–10685 (2005).
159. Zhang, S.-Z. *et al.* Knockdown of c-Met by adenovirus-delivered small interfering RNA inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1577–1584 (2005).
160. Nouredini, S. C. & Curiel, D. T. Genetic targeting strategies for adenovirus. *Mol. Pharm.* **2**, 341–347 (2005).
161. Moore, M. D., McGarvey, M. J., Russell, R. A., Cullen, B. R. & McClure, M. O. Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors. *J. Gene Med.* **7**, 918–925 (2005).
162. Tomar, R. S., Matta, H. & Chaudhary, P. M. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene* **22**, 5712–5715 (2003).
163. Babcock, A. M. *et al.* In vivo inhibition of hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by RNA interference. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **11**, 899–905 (2005).

164. Xia, H. *et al.* RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.* **10**, 816–820 (2004).
165. Ong, S. T., Li, F., Du, J., Tan, Y. W. & Wang, S. Hybrid cytomegalovirus enhancer-h1 promoter-based plasmid and baculovirus vectors mediate effective RNA interference. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1404–1412 (2005).
166. Ptak, K., Farrell, D., Panaro, N. J., Grodzinski, P. & Barker, A. D. The NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer: achievement and path forward. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2**, 450–460 (2010).
167. Moghimi, S. M. & Kissel, T. Particulate nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1451–1455 (2006).
168. Edelstein, M. L., Abedi, M. R. & Wixon, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J. Gene Med.* **9**, 833–842 (2007).
169. Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B. & McNeil, S. E. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharm.* **5**, 487–495 (2008).
170. Torchilin, V. P. *et al.* Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1972–1977 (2003).
171. Pasut, G. & Veronese, F. M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **161**, 461–472 (2012).
172. Resnier, P., Montier, T., Mathieu, V., Benoit, J.-P. & Passirani, C. A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials* **34**, 6429–6443 (2013).
173. Audouy, S. & Hoekstra, D. Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review). *Mol. Membr. Biol.* **18**, 129–143 (2001).
174. Moore, A., Medarova, Z., Potthast, A. & Dai, G. In vivo targeting of underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe. *Cancer Res.* **64**, 1821–1827 (2004).
175. Medarova, Z., Pham, W., Farrar, C., Petkova, V. & Moore, A. In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nat. Med.* **13**, 372–377 (2007).
176. Veisheh, O., Gunn, J. W. & Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 284–304 (2010).

177. Zhao, Y. *et al.* Quantum dot conjugates for targeted silencing of bcr/abl gene by RNA interference in human myelogenous leukemia K562 cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 5137–5143 (2010).
178. Jung, J. *et al.* Selective inhibition of human brain tumor cells through multifunctional quantum-dot-based siRNA delivery. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49**, 103–107 (2010).
179. Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F. & Aigner, A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther.* **12**, 461–466 (2005).
180. Taratula, O. *et al.* Multifunctional nanomedicine platform for cancer specific delivery of siRNA by superparamagnetic iron oxide nanoparticles-dendrimer complexes. *Curr. Drug Deliv.* **8**, 59–69 (2011).
181. Jiang, S., Eltoukhy, A. A., Love, K. T., Langer, R. & Anderson, D. G. Lipidoid-coated iron oxide nanoparticles for efficient DNA and siRNA delivery. *Nano Lett.* **13**, 1059–1064 (2013).
182. Qi, L., Shao, W. & Shi, D. JAM-2 siRNA intracellular delivery and real-time imaging by proton-sponge coated quantum dots. *J. Mater. Chem. B* **1**, 654–660 (2013).
183. Choi, H. S. *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165–1170 (2007).
184. Wang, Y., Li, Z., Han, Y., Liang, L. H. & Ji, A. Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA in vivo. *Curr. Drug Metab.* **11**, 182–196 (2010).
185. Wu, Z.-W., Chien, C.-T., Liu, C.-Y., Yan, J.-Y. & Lin, S.-Y. Recent progress in copolymer-mediated siRNA delivery. *J. Drug Target.* **20**, 551–560 (2012).
186. Nguyen, J. & Szoka, F. C. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? *Acc. Chem. Res.* **45**, 1153–1162 (2012).
187. Moghimi, S. M. *et al.* A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **11**, 990–995 (2005).
188. Hunter, A. C. & Moghimi, S. M. Cationic carriers of genetic material and cell death: a mitochondrial tale. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1203–1209 (2010).
189. Majoros, I. J., Myc, A., Thomas, T., Mehta, C. B. & Baker, J. R. PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules* **7**, 572–579 (2006).

190. Singha, K., Namgung, R. & Kim, W. J. Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic Acid Ther.* **21**, 133–147 (2011).
191. Pérez-Martínez, F. C., Ocaña, A. V., Pérez-Carrión, M. D. & Ceña, V. Dendrimers as vectors for genetic material delivery to the nervous system. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5101–5108 (2012).
192. Lee, J.-H. *et al.* Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Lett.* **190**, 202–207 (2009).
193. Patil, M. L. *et al.* Internally cationic polyamidoamine PAMAM-OH dendrimers for siRNA delivery: effect of the degree of quaternization and cancer targeting. *Biomacromolecules* **10**, 258–266 (2009).
194. Dai, J. *et al.* Polyethylenimine-grafted copolymer of poly(l-lysine) and poly(ethylene glycol) for gene delivery. *Biomaterials* **32**, 1694–1705 (2011).
195. Yuan, X., Naguib, S. & Wu, Z. Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 521–536 (2011).
196. Jeon, S. Y. *et al.* Co-delivery of Cbfa-1-targeting siRNA and SOX9 protein using PLGA nanoparticles to induce chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **35**, 8236–8248 (2014).
197. Rozema, D. B. *et al.* Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12982–12987 (2007).
198. Davis, M. E. & Brewster, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 1023–1035 (2004).
199. Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E. & Triche, T. J. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **65**, 8984–8992 (2005).
200. Liu, X. *et al.* The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials* **28**, 1280–1288 (2007).
201. Jean, M. *et al.* Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Ther.* **16**, 1097–1110 (2009).
202. Howard, K. A. *et al.* RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **14**, 476–484 (2006).

203. Mendoza-Espinosa, P., Moreno, A., Castillo, R. & Mas-Oliva, J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 8–15 (2008).
204. Lazaridis, T. Binding Affinity and Specificity from Computational Studies. *Curr. Org. Chem.* **6**, 1319–1332 (2002).
205. Davidson, T. J. *et al.* Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 10040–10046 (2004).
206. Chiu, Y.-L., Ali, A., Chu, C.-Y., Cao, H. & Rana, T. M. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem. Biol.* **11**, 1165–1175 (2004).
207. Simeoni, F., Morris, M. C., Heitz, F. & Divita, G. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2717–2724 (2003).
208. Williford, J.-M. *et al.* Recent advances in nanoparticle-mediated siRNA delivery. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16**, 347–370 (2014).
209. Nakase, I., Tanaka, G. & Futaki, S. Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Mol. Biosyst.* **9**, 855–861 (2013).
210. Lundin, P. *et al.* Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2535–2542 (2008).
211. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* **56**, 318–325 (2000).
212. Takeuchi, T. *et al.* Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem. Biol.* **1**, 299–303 (2006).
213. Kim, W. J. *et al.* Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **14**, 343–350 (2006).
214. Kumar, P. *et al.* Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* **448**, 39–43 (2007).

215. Arthanari, Y., Pluen, A., Rajendran, R., Aojula, H. & Demonacos, C. Delivery of therapeutic shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting BCR-ABL fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **145**, 272–280 (2010).
216. Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sötlü, T., Johansson, H. & Langel, U. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 2664–2671 (2007).
217. Bolhassani, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1816**, 232–246 (2011).
218. Deshayes, S. *et al.* Structural polymorphism of non-covalent peptide-based delivery systems: Highway to cellular uptake. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 2304–2314 (2010).
219. Gros, E. *et al.* A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 384–393 (2006).
220. Crombez, L. *et al.* Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4559–4569 (2009).
221. Veldhoen, S., Laufer, S. D., Trampe, A. & Restle, T. Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6561–6573 (2006).
222. Crowet, J.-M. *et al.* Modeling of non-covalent complexes of the cell-penetrating peptide CADY and its siRNA cargo. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 499–509 (2013).
223. Crombez, L. *et al.* A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **17**, 95–103 (2009).
224. Li, W. & Szoka, F. C. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm. Res.* **24**, 438–449 (2007).
225. Ambegia, E. *et al.* Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1669**, 155–163 (2005).
226. Landen, C. N. *et al.* Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res.* **65**, 6910–6918 (2005).
227. Landen, C. N. *et al.* Intraperitoneal delivery of liposomal siRNA for therapy of advanced ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1708–1713 (2006).

228. Mangala, L. S., Han, H. D., Lopez-Berestein, G. & Sood, A. K. Liposomal siRNA for ovarian cancer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **555**, 29–42 (2009).
229. Leonetti, J. P., Machy, P., Degols, G., Lebleu, B. & Leserman, L. Antibody-targeted liposomes containing oligodeoxyribonucleotides complementary to viral RNA selectively inhibit viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2448–2451 (1990).
230. Thierry, A. R., Rahman, A. & Dritschilo, A. Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 952–960 (1993).
231. Semple, S. C. *et al.* Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat. Biotechnol.* **28**, 172–176 (2010).
232. Dan, N. & Danino, D. Structure and kinetics of lipid–nucleic acid complexes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **205**, 230–239 (2014).
233. Koltover, I. An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery. *Science* **281**, 78–81 (1998).
234. Santel, A. *et al.* RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther.* **13**, 1360–1370 (2006).
235. Aleku, M. *et al.* Atu027, a Liposomal Small Interfering RNA Formulation Targeting Protein Kinase N3, Inhibits Cancer Progression. *Cancer Res.* **68**, 9788–9798 (2008).
236. Schultheis, B. *et al.* First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 4141–4148 (2014).
237. Akinc, A. *et al.* A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **26**, 561–569 (2008).
238. Frank-Kamenetsky, M. *et al.* Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11915–11920 (2008).
239. Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Ciccarone, V. C. & Price, P. J. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J. Neurosci. Methods* **112**, 95–99 (2001).
240. Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7413–7417 (1987).

241. Rossi, J. J. RNAi therapeutics: SNALPing siRNAs in vivo. *Gene Ther.* **13**, 583–584 (2006).
242. Zimmermann, T. S. *et al.* RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**, 111–114 (2006).
243. Coelho, T. *et al.* Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **369**, 819–829 (2013).
244. Yousefi, A. *et al.* Anginex lipoplexes for delivery of anti-angiogenic siRNA. *Int. J. Pharm.* **472**, 175–184 (2014).
245. Kong, W. H. *et al.* Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. *Biomaterials* **34**, 542–551 (2013).
246. Kim, H. R. *et al.* Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA. *Mol. Pharm.* **5**, 622–631 (2008).
247. Yu, Y. H. *et al.* Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **80**, 268–273 (2012).
248. Xue, H.-Y. & Wong, H.-L. Solid lipid-PEI hybrid nanocarrier: an integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner. *ACS Nano* **5**, 7034–7047 (2011).
249. Lobovkina, T. *et al.* In vivo sustained release of siRNA from solid lipid nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 9977–9983 (2011).
250. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E. & Benoit, J.-P. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* **19**, 875–880 (2002).
251. Heurtault, B. *et al.* The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **18**, 55–61 (2003).
252. Dulieu, C. & Bazile, D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. *Pharm. Res.* **22**, 285–292 (2005).
253. Thomas, O. & Lagarce, F. Lipid Nanocapsules: A Nanocarrier Suitable for Scale-Up Process. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **23**, 555–559 (2013).
254. Lagarce, F. & Passirani, C. Nucleic-Acid Delivery Using Lipid Nanocapsules. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **17**, 723–727 (2016).
255. Resnier, P. *et al.* EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells in vitro. *Int. J. Pharm.* **454**, 748–755 (2013).

256. Skandrani, N. *et al.* Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging. *Nanoscale* **6**, 7379–7390 (2014).
257. Accueil | LEEM - Les entreprises du médicament. Available at: <http://www.leem.org/>. (Accessed: 21st April 2018)
258. Behlke, M. A. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **13**, 644–670 (2006).
259. Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y. & Leung, S. W. S. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **4**, e252 (2015).
260. Stevens, A. J. *et al.* The role of public-sector research in the discovery of drugs and vaccines. *N. Engl. J. Med.* **364**, 535–541 (2011).
261. McMillan, G. S., Narin, F. & Deeds, D. L. An analysis of the critical role of public science in innovation: the case of biotechnology. *Res. Policy* **29**, 1–8 (2000).
262. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., Doss, C. G. P. & Lee, S.-S. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **8**, 132–143 (2017).
263. Lazonick, W. & Tulum, Ö. US biopharmaceutical finance and the sustainability of the biotech business model. *Res. Policy* **40**, 1170–1187 (2011).
264. Haussecker, D. The business of RNAi therapeutics. *Hum. Gene Ther.* **19**, 451–462 (2008).
265. Haussecker, D. The Business of RNAi Therapeutics in 2012. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **1**, e8 (2012).
266. Jana, S., Chakraborty, C., Nandi, S. & Deb, J. K. RNA interference: potential therapeutic targets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 649–657 (2004).
267. Vaishnav, A. K. *et al.* A status report on RNAi therapeutics. *Silence* **1**, 14 (2010).
268. Brafman, A. *et al.* Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP801-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 3796–3805 (2004).
269. Rittenhouse, K. D. *et al.* Dose-Related Gene Silencing of RTP801 With the siRNA PF04523655 in Long Evans Rat Models of STZ Induced Diabetes and Laser Induced CNV. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 6447–6447 (2010).
270. Rittenhouse, K. D. *et al.* Characterization of Regional RTP801 Gene Expression Within the Retina and the Concentration-Effect Relationship of PF-655, an RTP801-silencing siRNA,

- Following Intravitreal Administration to Diabetic Rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 5641–5641 (2011).
271. Nguyen, Q. D. *et al.* Evaluation of the siRNA PF-04523655 versus ranibizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration (MONET Study). *Ophthalmology* **119**, 1867–1873 (2012).
 272. Rittenhouse, K. D. *et al.* RTP801 gene expression is differentially upregulated in retinopathy and is silenced by PF-04523655, a 19-Mer siRNA directed against RTP801. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 1232–1240 (2014).
 273. Nguyen, Q. D. *et al.* Phase 1 dose-escalation study of a siRNA targeting the RTP801 gene in age-related macular degeneration patients. *Eye Lond. Engl.* **26**, 1099–1105 (2012).
 274. Rosenfeld, P. J. *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1419–1431 (2006).
 275. Titze-de-Almeida, R., David, C. & Titze-de-Almeida, S. S. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharm. Res.* **34**, 1339–1363 (2017).
 276. Enslow, R. *et al.* Association of Anti-VEGF Injections with Progression of Geographic Atrophy. *Ophthalmol. Eye Dis.* **8**, 31–32 (2016).
 277. Gemenetzi, M., Lotery, A. J. & Patel, P. J. Risk of geographic atrophy in age-related macular degeneration patients treated with intravitreal anti-VEGF agents. *Eye Lond. Engl.* **31**, 1–9 (2017).
 278. Amadio, M., Govoni, S. & Pascale, A. Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacol. Res.* **103**, 253–269 (2016).
 279. Kisiswa, L., Dervan, A. G., Albon, J., Morgan, J. E. & Wride, M. A. Retinal ganglion cell death postponed: giving apoptosis a break? *Ophthalmic Res.* **43**, 61–78 (2010).
 280. Levin, L. A. Axonal loss and neuroprotection in optic neuropathies. *Can. J. Ophthalmol. J. Can. Ophthalmol.* **42**, 403–408 (2007).
 281. Schmidt, K.-G., Bergert, H. & Funk, R. H. W. Neurodegenerative diseases of the retina and potential for protection and recovery. *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 164–178 (2008).
 282. Kurokawa, T. *et al.* BDNF diminishes caspase-2 but not c-Jun immunoreactivity of neurons in retinal ganglion cell layer after transient ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 3006–3011 (1999).

283. Singh, M. *et al.* Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *J. Neurochem.* **77**, 466–475 (2001).
284. Vigneswara, V., Berry, M., Logan, A. & Ahmed, Z. Pharmacological inhibition of caspase-2 protects axotomised retinal ganglion cells from apoptosis in adult rats. *PLoS One* **7**, e53473 (2012).
285. Ahmed, Z. *et al.* Ocular neuroprotection by siRNA targeting caspase-2. *Cell Death Dis.* **2**, e173 (2011).
286. Solano, E. C. R. *et al.* Toxicological and pharmacokinetic properties of QPI-1007, a chemically modified synthetic siRNA targeting caspase 2 mRNA, following intravitreal injection. *Nucleic Acid Ther.* **24**, 258–266 (2014).
287. eyal. Quark Pharmaceuticals Awarded Key Patent for QPI-1007 Ocular Neuroprotectant. *Quark Pharmaceuticals*
288. Martínez, T. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of SYL040012, a novel siRNA compound for treatment of glaucoma. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **22**, 81–91 (2014).
289. Quigley, H. A. Glaucoma. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 1367–1377 (2011).
290. Coleman, A. L. & Miglior, S. Risk factors for glaucoma onset and progression. *Surv. Ophthalmol.* **53 Suppl1**, S3-10 (2008).
291. Weinreb, R. N. & Khaw, P. T. Primary open-angle glaucoma. *Lancet Lond. Engl.* **363**, 1711–1720 (2004).
292. Weinreb, R. N., Aung, T. & Medeiros, F. A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA* **311**, 1901–1911 (2014).
293. Müller, M. E., van der Velde, N., Krulder, J. W. M. & van der Cammen, T. J. M. Syncope and falls due to timolol eye drops. *BMJ* **332**, 960–961 (2006).
294. Mäenpää, J. & Pelkonen, O. Cardiac safety of ophthalmic timolol. *Expert Opin. Drug Saf.* **15**, 1549–1561 (2016).
295. Vander Zanden, J. A. *et al.* Systemic adverse effects of ophthalmic beta-blockers. *Ann. Pharmacother.* **35**, 1633–1637 (2001).
296. Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A. & Eid, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 357–372 (2007).

297. Milner, M. S. *et al.* Dysfunctional tear syndrome: dry eye disease and associated tear film disorders - new strategies for diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **27 Suppl 1**, 3–47 (2017).
298. Al-Saedi, Z. *et al.* Dry Eye Disease: Present Challenges in the Management and Future Trends. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 4470–4490 (2016).
299. Bellomo, R., Kellum, J. A. & Ronco, C. Acute kidney injury. *Lancet Lond. Engl.* **380**, 756–766 (2012).
300. Brown, J. R., Rezaee, M. E., Marshall, E. J. & Matheny, M. E. Hospital Mortality in the United States following Acute Kidney Injury. *BioMed Res. Int.* **2016**, 4278579 (2016).
301. Hoste, E. A. J. & Schurgers, M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit. Care Med.* **36**, S146-151 (2008).
302. Bonegio, R. & Lieberthal, W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **11**, 301–308 (2002).
303. Molitoris, B. A. *et al.* siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **20**, 1754–1764 (2009).
304. Braasch, D. A. *et al.* Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1139–1143 (2004).
305. Agrawal, S., Temsamani, J., Galbraith, W. & Tang, J. Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Clin. Pharmacokinet.* **28**, 7–16 (1995).
306. Garin, D. *et al.* In vivo siRNA distribution and pharmacokinetics assessed by nuclear imaging are modulated according to radiolabelling site. *Nucl. Med. Biol.* **42**, 958–966 (2015).
307. Sands, H. *et al.* Biodistribution and metabolism of internally 3H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate. *Mol. Pharmacol.* **45**, 932–943 (1994).
308. van de Water, F. M. *et al.* Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **34**, 1393–1397 (2006).
309. Viel, T. *et al.* Molecular imaging study on in vivo distribution and pharmacokinetics of modified small interfering RNAs (siRNAs). *Oligonucleotides* **18**, 201–212 (2008).

310. eyal. Quark Pharmaceuticals and Major Pharmaceutical Company Enter into Licensing Option Agreement for the p53 Suppressor Drug QPI-1002, the First siRNA Administered Systemically in Human. *Quark Pharmaceuticals*
311. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–166 (2009).
312. Liu, X. Targeting Polo-Like Kinases: A Promising Therapeutic Approach for Cancer Treatment. *Transl. Oncol.* **8**, 185–195 (2015).
313. Alabi, C., Vegas, A. & Anderson, D. Attacking the genome: emerging siRNA nanocarriers from concept to clinic. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 427–433 (2012).
314. Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* **12**, 967–977 (2013).
315. Gutteridge, R. E. A., Ndiaye, M. A., Liu, X. & Ahmad, N. Plk1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Laboratory to Clinics. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 1427–1435 (2016).
316. Unsal-Kacmaz, K. *et al.* The interaction of PKN3 with RhoC promotes malignant growth. *Mol. Oncol.* **6**, 284–298 (2012).
317. Santel, A. *et al.* Atu027 Prevents Pulmonary Metastasis in Experimental and Spontaneous Mouse Metastasis Models. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5469–5480 (2010).
318. Conroy, T. *et al.* Current standards and new innovative approaches for treatment of pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **57**, 10–22 (2016).
319. Ansari, D., Gustafsson, A. & Andersson, R. Update on the management of pancreatic cancer: surgery is not enough. *World J. Gastroenterol.* **21**, 3157–3165 (2015).
320. Zorde Khvalevsky, E. *et al.* Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20723–20728 (2013).
321. Shemi, A., Khvalevsky, E. Z., Gabai, R. M., Domb, A. & Barenholz, Y. Multistep, effective drug distribution within solid tumors. *Oncotarget* **6**, 39564–39577 (2015).
322. Hunter, J. C. *et al.* In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic K-Ras G12C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8895–8900 (2014).
323. Lito, P., Solomon, M., Li, L.-S., Hansen, R. & Rosen, N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science* **351**, 604–608 (2016).

324. Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A. & Shokat, K. M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **503**, 548–551 (2013).
325. Lü, J.-M. *et al.* Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**, 325–341 (2009).
326. Kapoor, D. N. *et al.* PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther. Deliv.* **6**, 41–58 (2015).
327. Sekijima, Y. Recent progress in the understanding and treatment of transthyretin amyloidosis. *J. Clin. Pharm. Ther.* **39**, 225–233 (2014).
328. Hawkins, P. N. *et al.* Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Ann. Med.* **47**, 625–638 (2015).
329. Adams, D. *et al.* First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Curr. Opin. Neurol.* **29 Suppl 1**, S14-26 (2016).
330. Adams, D. *et al.* TTR kinetic stabilizers and TTR gene silencing: a new era in therapy for familial amyloidotic polyneuropathies. *Expert Opin. Pharmacother.* **17**, 791–802 (2016).
331. Kerschen, P. & Planté-Bordeneuve, V. Current and Future Treatment Approaches in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy. *Curr. Treat. Options Neurol.* **18**, 53 (2016).
332. Lindow, M. & Kauppinen, S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J. Cell Biol.* **199**, 407–412 (2012).
333. van Rooij, E. & Kauppinen, S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* **6**, 851–864 (2014).
334. Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T. F. & Zeisel, M. B. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* **62**, 448–457 (2015).
335. Thibault, P. A. & Wilson, J. A. Targeting miRNAs to treat Hepatitis C Virus infections and liver pathology: Inhibiting the virus and altering the host. *Pharmacol. Res.* **75**, 48–59 (2013).
336. Bobbin, M. L. & Rossi, J. J. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**, 103–122 (2016).
337. Burnett, J. C. & Rossi, J. J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* **19**, 60–71 (2012).
338. Ojha, C. R., Rodriguez, M., Dever, S. M., Mukhopadhyay, R. & El-Hage, N. Mammalian microRNA: an important modulator of host-pathogen interactions in human viral infections. *J. Biomed. Sci.* **23**, 74 (2016).

339. Janssen, H. L. A. *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1685–1694 (2013).
340. Yu, M.-L. Hepatitis C treatment from ‘response-guided’ to ‘resource-guided’ therapy in the transition era from interferon-containing to interferon-free regimens. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 1436–1442 (2017).

Interférence ARN : utilisation thérapeutique et vectorisation

L'ARNi est une voie de régulation de l'expression des gènes dont la découverte récente en 1998 a révolutionné le monde de la génétique, de la biologie cellulaire et de la médecine. La communauté scientifique a en effet découvert que de petits ARN non codants, les siARN, les miARN et les piARN, jusque-là inconnus, participaient à la régulation post-transcriptionnelle, voire transcriptionnelle chez certaines espèces. Ainsi, ils pouvaient intervenir aussi bien dans l'expression de certains gènes que dans la protection du génome contre les effets néfastes des transposons. Mieux encore, l'introduction artificielle de petits ARN double-brin dans les cellules permet d'éteindre très spécifiquement l'expression d'un gène par une destruction massive et temporaire de ses ARNm. Compte tenu du caractère avant tout naturel de ce mécanisme, l'extinction obtenue est très robuste et spécifique, ce qui fait de l'ARNi un système révolutionnaire pour étudier la fonction des gènes, valider de potentielles cibles thérapeutiques et même développer de nouvelles thérapeutiques. Cette nouvelle façon d'éteindre les gènes a ouvert la voie à des milliers d'études au cours desquelles l'expression de gènes impliqués dans des maladies humaines était supprimée par des ARN interférents. Malgré tout, un obstacle majeur à l'utilisation répandue de l'ARNi s'est présenté : disposer de techniques efficaces de délivrance de ces ARN. Les connaissances perpétuellement étoffées en nanotechnologies ont permis d'associer les ARN interférents à des molécules complexes afin de formuler des NP injectables pour la voie systémique. Depuis 2004, les laboratoires pharmaceutiques ont développé des traitements utilisant l'ARNi contre de nombreuses maladies, qu'elles soient virales, dégénératives, métaboliques, ou cancéreuses. Aujourd'hui, des thérapeutiques pléthoriques basées sur l'ARNi sont à l'étude en phase clinique, pour lesquelles différents types de vecteurs de transfection peuvent ou non être utilisés. Les essais cliniques les plus avancés sont déjà en phase III et une mise sur le marché des premiers médicaments à base de siARN peut être à prévoir prochainement.

Mots-clés : interférence ARN, ARN double brin, gène, nanotechnologie, médecine humaine, essai clinique

RNA interference: therapeutic use and vectorization

RNAi is a regulatory pathway for gene expression whose recent discovery in 1998 revolutionized the world of genetics, cell biology and medicine. Indeed, the scientific community has discovered that small non-coding RNA, siRNA, miRNA and piRNA, previously unknown, participate in post-transcriptional or even transcriptional regulation in some species. Thus, they could intervene as well in expression of certain genes as in protection of genome against the harmful effects of transposons. Even better, artificial introduction of small double-stranded RNA in cells makes it possible to very specifically silence expression of a gene by a massive and temporary destruction of its mRNA. Given natural type of this mechanism, resulting extinction is very robust and specific, making RNAi a revolutionary system to study function of genes, validate potential therapeutic targets and even develop new therapeutics. This new method to silence genes has opened the way for thousands of studies in which expression of genes involved in human diseases was suppressed by interfering RNA. Nevertheless, a major obstacle to the widespread use of RNAi has been to possess effective techniques for delivering these RNA. Continually expanded knowledge in nanotechnology has allowed interfering RNA to be associated with complex molecules in order to formulate injectable NP to systemic pathway. Since 2004, pharmaceutical companies have developed treatments using RNAi against many diseases, whether viral, degenerative, metabolic, or cancerous. Today, many RNAi-based therapeutics are under study in clinical phase, for which different types of transfection vectors may or may not be used. The most advanced clinical trials are already in phase III and a marketing of the first siRNA-based drugs may be expected soon.

Keywords : RNA interference, double stranded RNA, gene, nanotechnology, human medicine, clinical trial