

Université
de Liège



Faculté de Médecine

Laboratoire de Technologie
Pharmaceutique et Biopharmacie
Professeur B. Evrard

Laboratoire de Signalisation et
Interactions des Protéines
Professeur F. Dequiedt

2016

DÉVELOPPEMENT DE VECTEURS POLYMÈRES
DE TYPE POLYPLEXES À BASE DE NOUVEAUX
POLYMÈRES CATIONIQUES BIODÉGRADABLES
DE TYPE POLYCARBONATES ET DE siRNA
DIRIGÉS SPÉCIFIQUEMENT CONTRE
DES HISTONES DÉACÉTYLASES

Antoine Frère

Promoteurs : Docteurs G. Piel et D. Mottet

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques



REMERCIEMENTS

Pendant les quatre dernières années, de nombreuses personnes ont contribué à la réalisation de cette thèse. Sans leur aide, leurs précieux conseils et leur soutien, ce travail n'aurait pas été possible. Je tiens donc à les remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux promoteurs de thèse, les Docteurs Géraldine Piel et Denis Mottet, de m'avoir permis de travailler sur ce projet ambitieux et passionnant, et de m'avoir suivi, guidé et soutenu tout au long de ces quatre années. Je les remercie aussi pour leurs nombreuses corrections durant la rédaction de cette thèse, qui ont parfois agrémenté leurs soirées et week-ends.

Je tiens aussi à remercier particulièrement le Professeur Brigitte Evrard de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, le Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie, pour son soutien et pour m'avoir prodigué de nombreux conseils.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mesdames et Messieurs les Membres du Comité de thèse, qui m'ont suivi tout au long de ce travail et qui ont guidé la réalisation de ces travaux, ainsi qu'à Mesdames et Messieurs les Membres du Jury qui me font l'honneur de juger cette thèse.

Plus particulièrement, je tiens à remercier le Docteur Olivier Peulen pour le suivi fréquent de l'avancée du projet et ses conseils avisés.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé dans le soutien financier du FNRS et des Fonds Léon Frédéricq, que je tiens à remercier vivement.

Je tiens également à remercier tous les membres du Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie, anciens et actuels, pour leur accueil, la bonne ambiance de travail, les « beer hours », sans oublier leurs aides techniques et scientifiques. Merci à Françoise Léonard, Laurence Collard, Fabrice Krier, Aude Pestieau, Marie Piette, Anna Lechanteur, Tania Furst, Gilles Dufour, Justine Thiry, Charline Defourny, Claudio Palazzo dit « Claude Palace », Maria-Luz Alvarez, Reatul Karim, William Bigazzi, Gaultier Purper, Aline Leballue, Martine Cao et Annabelle Hamande.

Merci aussi aux membres du Laboratoire de Signalisation et Interactions des Protéines et du Laboratoire de Recherche sur les Métastases, pour m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire et de culture cellulaire. Je remercie plus particulièrement Élodie Hendrick, Paul Peixoto, Naïma Maloujahnoum, Vincent Hennequière, Nicolas Mathéus et Catherine Polèse.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre de nombreux chercheurs et laboratoires, experts dans leur domaine. Ces collaborations ont été très enrichissantes sur le plan scientifique, me faisant découvrir de nombreuses disciplines.

Plus particulièrement, je remercie les membres du Service des Matériaux Polymère et Composites de l'Université de Mons, partenaires essentiels à la réalisation de ce projet. Merci à Laetitia Mespouille, Alexandra Baroni, Sarah Tempelaar, Michal Kawalec et au Professeur Philippe Dubois.

Merci à Georges Feller du Centre d'Ingénierie des Protéines de l'ULg pour son aide indispensable dans la mise au point de la technique d'TTC.

Merci à George Dakwar du «Laboratory for General Biochemistry and Physical Pharmacy» de l'Université de Gand pour son aide pour les mesures de FCS et de fSPT.

Merci à Anne-Sophie Delvigne et Julie Laloy du « Namur Nanosafety Centre » de l'Université de Namur pour la réalisation des tests d'hémocompatibilité.

Merci à François Orange du Centre Commun de Microscopie Appliquée de l'Université de Nice – Sophia Antipolis pour les images de microscopie électronique.

Merci à Sandra Ormenese et à Raafat Stephan de la Plateforme Imagerie et Cytométrie en Flux du GIGA.

Merci aussi à Fabrice Olivier, Marie Dehuy, Natacha Leroi, Jonathan Cimino et Maud Vandereyken pour leur aide pendant les expériences in vivo.

Finalement, je voudrais remercier ma famille, tous mes amis ainsi que Chloé, pour leur soutien de tous les jours, le réconfort qu'ils apportent, et leur curiosité quant à mon sujet de recherche, même si je doute qu'ils aient tout compris.

Antoine

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
I. LA THÉRAPIE GÉNIQUE	3
I.1. L'interférence par ARN (ARNi)	4
I.2. Les siRNA	5
I.3. L'administration de siRNA.....	6
II. LA VECTORISATION	7
II.1. Principes et intérêts.....	7
II.2. Les différents types de vecteurs en thérapie génique.....	8
II.2.1. Les vecteurs viraux.....	8
II.2.2. Les vecteurs non viraux	9
III. LES VECTEURS POLYMÈRES DE siRNA POUR L'ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE	17
III.1. Généralités.....	17
III.2. Les paramètres physico-chimiques essentiels des polyplexes.....	18
III.2.1. Le niveau de complexation du siRNA	18
III.2.2. La taille	19
III.2.3. La charge de surface	21
III.2.4. La stabilité.....	22
III.3. Les contraintes liées à l'administration IV de polyplexes	23
III.3.1. L'adsorption des protéines plasmatiques.....	23
III.3.2. La dégradation par les nucléases	30
III.3.3. Le ciblage de la tumeur.....	30
III.4. L'endocytose	33
III.5. La libération de l'endosome	35
III.6. Le relargage du siRNA des polyplexes	37
IV. LA CIBLE : LES HISTONES DÉACÉTYLASES (HDAC)	39
IV.1. L'acétylation des histones.....	39
IV.2. La classification des HDAC.....	40
IV.3. Les inhibiteurs d'HDAC en oncologie.....	41
V. RÉFÉRENCES	44
VI. CHAPITE DE LIVRE	53

OBJECTIFS ET PLAN DE THÈSE	93
PARTIE EXPÉRIMENTALE	97
I. INFLUENCE DE LA STRUCTURE DES POLYCARBONATES ALIPHATIQUES SUR LEUR CAPACITÉ À FORMER DES POLYPLEXES AUX CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ADÉQUATES POUR L'INJECTION IV ET EFFICACES <i>IN VITRO</i>	99
I.1. Résumé des résultats.....	103
I.2. Résultats	106
I.2.1. Publication	106
I.2.2. Supporting information.....	133
I.2.3. Résultats non publiés	136
I.3. Discussion et conclusions	138
I.4. Références.....	140
II. MISE EN ÉVIDENCE DES AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA PEGYLATION DES POLYCARBONATES EN VUE DE LEUR ADMINISTRATION <i>IN VIVO</i>	145
II.1. Résumé des résultats	148
II.2. Résultats	152
II.2.1. Publication	152
II.2.2. Supporting Information	180
II.3. Discussion et conclusions	185
II.4. Références	188
III. ALTERNATIVE À LA PEGYLATION : L'ACIDE HYALURONIQUE	191
III.1. Introduction	193
III.2. Matériels et méthodes	195
III.2.1. La formation des polyplexes	195
III.2.2. L'efficacité de dégradation de l'ARNm en présence de sérum.....	196
III.3. Résultats.....	196
III.3.1. L'incorporation, la taille et le potentiel zêta	196
III.3.2. Le comportement en présence de sérum	197
III.4. Discussion	201
III.5. Conclusions	204
III.6. Références	205
DISCUSSION GÉNÉRALE	207
I. LES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES	210

I.1. Le niveau de complexation du siRNA.....	210
I.2. La taille	211
I.3. La charge de surface	212
I.4. La stabilité.....	213
II. LES CONTRAINTES LIÉES À L'ADMINISTRATION IV	214
II.1. L'adsorption des protéines plasmatiques.....	214
II.2. Le ciblage de la tumeur	216
III. L'ENDOCYTOSE	217
IV. LA LIBÉRATION DE L'ENDOSOME ET LA DÉGRADATION DE L'ARNM	220
V. LA TOXICITÉ.....	223
VI. RÉFÉRENCES.....	224
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	227
RÉSUMÉ.....	233
SUMMARY	237

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
AAV1	Virus Adéno-Associé de type 1
ABC	<i>Accelerated Blood Clearance</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
APC	<i>Aliphatic Polycarbonate</i> (Polycarbonate Aliphatique)
ARN	Acide Rinonucléique
ARNi	Interférence par ARN
ARNm	ARN messenger
ASGP-R	Récepteur d'Asialoglycoprotéine
C	Cytosine
CavME	<i>Caveolae-Mediated Endocytosis</i> (Endocytose Cavéole-Dépendante)
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CME	<i>Clathrin-Mediated Endocytosis</i> (Endocytose Clathrine-Dépendante)
CUPID	<i>Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Diffusion Dynamique de la Lumière)
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DOPG	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane
DSPE-PEG	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyéthylène glycol)]
dT	Désoxythymidine
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agence Européenne des Médicaments)
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
fsPT	<i>Fluorescence Single-Particle Tracking</i>
G	Guanine
HA	<i>Hyaluronic Acid</i> (Acide Hyaluronique)
HDAC	Histone Déacétylase
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
IgG	Immunoglobuline de type G
IgM	Immunoglobuline de type M
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (Titration Calorimétrique Isotherme)
IV	Intraveineuse
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoprotéine de Basse Densité)
LDV	<i>Laser Doppler Velocimetry</i> (Vélocimétrie Laser Doppler)
LRM	Laboratoire de Recherche sur les Métastases
LTPB	Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i> (Multirésistance aux Médicaments)
MEB	Microscopie Électronique à Balayage

INTRODUCTION

MET	Microscopie Électronique à Transmission
miRNA	Micro ARN
MMP	Métalloprotéinase Matricielle
NAD⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Principe Actif
PAMAM	Poly(amidoamine)
PC	Phosphatidylcholine
PCG	Polycarbonate fonctionnalisé par des groupements Guanidines
PCL	Polycaprolactone
PCM	Polycarbonate fonctionnalisé par des groupements Morpholines
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en Chaîne par Polymérase)
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i> (Spectroscopie à Corrélation de Photons)
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEI	Polyéthylènimine
PEG	Polyéthylène Glycol
PLA	Acide Polylactique
PLGA	Acide Poly(Lactique-co-Glycolique)
PLK1	Polo-Like Kinase I
PLL	Poly-L-Lysine
PPG	Polypropylène Glycol
PSI	<i>Protein Signalisation and Interaction</i> (Laboratoire de Signalisation et Interactions des Protéines)
PTMC	Poly(triméthylène Carbonate)
RGD	Arginine-Glycine-Aspartate
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNase	Ribonucléase
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SERCA2a	<i>Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase</i> (Ca ²⁺ -ATPase du réticulum sarcoplasmique)
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i> (Petit ARN en épingle à cheveux)
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> (Petit ARN interférent)
SMPC	Service des Matériaux Polymère et Composites
SPT	<i>Single Particle Tracking</i>
TAT	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TE	Tris-EDTA
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TMC	Triméthylène Carbonate
TTR	Transthyrétine
U	Uracile
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

Une partie de cette introduction a fait l'objet d'une publication sous la forme d'un chapitre intitulé « *Polymeric Nanoparticles as siRNA Drug Delivery System for Cancer Therapy: the Long Road to Therapeutic Efficiency* » publié dans le livre « *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* » (ISBN : 978-0-323-47347-7) en cours d'édition par Elsevier [1], et disponible au point **VI**.

I. LA THÉRAPIE GÉNIQUE

De nombreuses pathologies humaines sont caractérisées par des dysfonctionnements génétiques. Ceux-ci peuvent engendrer des altérations au niveau de la production de protéines essentielles (par exemple celles produites par les gènes suppresseurs de tumeur), ou favoriser la production de protéines responsables du développement d'une pathologie (comme les oncoprotéines) [2]. La thérapie génique, c'est-à-dire l'administration de matériel génétique (ADN ou ARN) au niveau cellulaire, est une approche thérapeutique prometteuse pour traiter ces pathologies. L'objectif est de modifier l'expression génique du patient, de façon transitoire ou définitive. La thérapie génique a aussi des applications en thérapie cellulaire, où la modification génétique est réalisée sur les cellules *ex vivo*, avant qu'elles ne soient réintroduites chez le patient [3].

Le remplacement d'un gène défectueux a été élaboré pour le traitement des pathologies monogéniques causées par le dysfonctionnement d'un seul gène comme la mucoviscidose ou la phénylcétonurie. Dans le cas de la mucoviscidose, une étude clinique de phase IIb a été réalisée pour un traitement à base d'un plasmide contenant l'ADN complémentaire du gène codant pour CFTR (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), une protéine qui intervient dans le mécanisme d'hydratation du mucus. Cette étude montre une amélioration significative de la fonction pulmonaire du groupe traité (n=78) par rapport au groupe placebo (n=62), encourageante pour une future utilisation clinique [4].

À côté des pathologies monogéniques, des pathologies, comme les maladies cardiovasculaires ou le cancer, résultent de dérégulations géniques mais aussi épigénétiques [5]. Le remplacement d'un seul gène défectueux n'est donc pas suffisant. D'autres stratégies doivent être envisagées, par exemple l'administration d'un gène non dérégulé, mais codant pour une protéine capable d'aider l'organisme à combattre la maladie. Parmi les recherches prometteuses, on peut citer le projet CUPID (*Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease*) pour le traitement de l'insuffisance cardiaque sévère. Cette pathologie est souvent associée à un défaut du transport du calcium

dans les cellules du myocarde. Il a été montré que la surexpression de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA2a pour *Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase*) améliorait la fonction cardiaque malgré le fait que le gène ne soit pas défectueux. L'administration du gène SERCA2a a fait l'objet d'une étude clinique de phase II, montrant des résultats encourageants sur la fonction cardiaque [6, 7].

Outre la possibilité de remplacer un gène défectueux, la thérapie génique ouvre la perspective de réduire l'expression de protéines qui favorisent le développement d'une pathologie, comme les oncoprotéines, grâce au mécanisme de l'interférence par ARN (ARNi) [2].

I.1. L'INTERFÉRENCE PAR ARN (ARNi)

Le mécanisme de l'ARNi a été découvert chez les plantes au début des années 1990, et confirmé dans le modèle du nématode *Caenorhabditis elegans* en 1998 par Andrew Z. Fire et Craig C. Mello. Cette découverte a été couronnée par l'obtention du prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006 [8, 9]. Ce mécanisme permet de diminuer sélectivement l'expression d'une protéine grâce au clivage de son ARN messager (ARNm) correspondant par l'action d'un ARN double brin homologue.

Ce mécanisme se retrouve de façon endogène dans de nombreuses cellules eucaryotes. Après la transcription du micro ARN (miRNA) dans le noyau, celui-ci se replie sur lui-même pour former un ARN double-brin, qui sera clivé puis envoyé dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, cet ARN double-brin, aussi appelé shRNA (*short hairpin RNA*) est clivé par une ribonucléase III (RNase III), appelée Dicer, en fragments d'environ 19 à 25 paires de bases, appelés petits ARN interférents (siRNA pour *small interfering RNA*) (Figure 1).

Le siRNA est capable de reconnaître le complexe enzymatique RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui sépare le siRNA double brin en deux chaînes d'ARN simple brin, dont une est dégradée tandis que l'autre est chargée sur le complexe RISC. Une fois ce complexe chargé de l'ARN simple brin, il devient capable de s'associer à l'ARNm comprenant la séquence complémentaire au siRNA et de le cliver en petits fragments. L'ARNm dégradé ne peut plus être traduit en protéine correspondante. Le niveau d'expression de cette protéine et par conséquent sa fonction sont ainsi diminués [10-13].

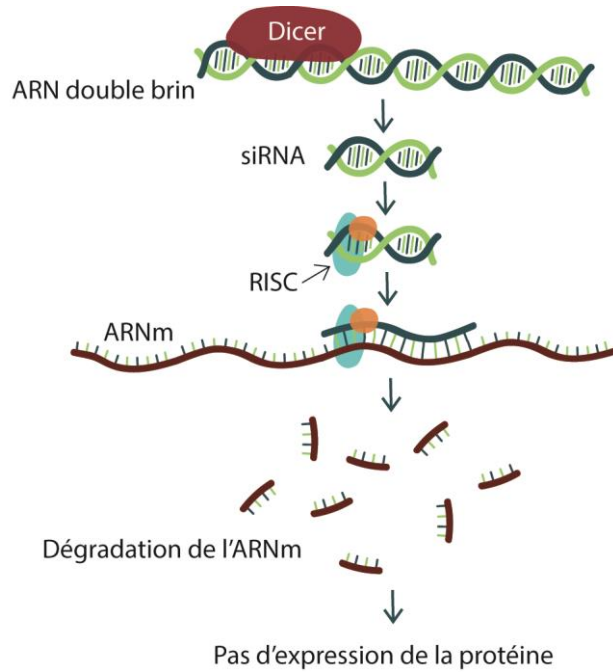


Figure 1. Mécanisme d'action de l'interférence par ARN. Dans le cytoplasme, l'ARN double-brin provenant du noyau est clivé par Dicer en fragments appelés siRNA. Une fois le siRNA chargé sur le complexe RISC, celui-ci devient capable de s'associer à l'ARNm complémentaire au siRNA et de le dégrader.

I.2. LES siRNA

Le mécanisme d'interférence par ARN peut être utilisé de façon exogène en introduisant du siRNA synthétique dans le cytoplasme des cellules. Les siRNA sont composés de deux brins d'ARN appariés, un sens et un antisens, d'environ 19 à 25 paires de bases (Figure 2). Ces bases sont celles de l'ARN : adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et uracile (U). Les siRNA comprennent des extrémités 3' qui dépassent du double brin de deux nucléotides afin de mimer le clivage endogène par Dicer. Les nucléotides dépassant des extrémités 3' peuvent être remplacés par des désoxythymidines de l'ADN (dT) pour augmenter la résistance du siRNA à l'action des nucléases [14, 15].

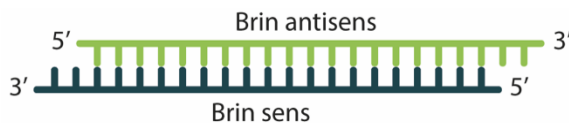


Figure 2. Structure générale d'un siRNA.

La structure du siRNA peut être optimisée afin d'en augmenter l'efficacité. Reynolds a ainsi montré qu'un contenu en bases G/C modéré à faible (30 – 52 %), qu'au moins 3 bases A/U aux positions 15-19 (brin sens), que l'absence de répétitions internes, qu'une base A aux positions 3 et 19 (brin sens), qu'une base U à la position 10 (brin sens), et que l'absence de base G/C à la position 19 (brin sens) permettent d'augmenter l'efficacité des siRNA [16].

I.3. L'ADMINISTRATION DE siRNA

L'introduction dans le cytoplasme d'un siRNA de séquence de nucléotides homologue à l'ARNm mène à une diminution transitoire de l'expression d'une protéine ciblée [11, 14]. La technologie d'interférence par ARN induite par les siRNA représente donc une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement de nombreuses pathologies, comme les pathologies cardiovasculaires, neurodégénératives ou le cancer [17, 18].

Cependant, un obstacle majeur à l'utilisation des siRNA *in vivo* est la difficulté d'acheminer ce matériel génétique jusqu'aux cellules cibles. En effet, administré seul, le siRNA est sensible aux nucléases, ce qui résulte en une dégradation rapide et un temps de demi-vie très court [19]. De plus, le caractère anionique et la masse moléculaire élevée du siRNA limitent sa diffusion à travers les membranes cellulaires. Seul, il n'est donc pas capable d'atteindre le cytoplasme des cellules cibles [20]. En conséquence, les laboratoires pharmaceutiques et universitaires recherchent activement à développer des systèmes efficaces de délivrance des siRNA pour des applications *in vivo*.

II. LA VECTORISATION

Parmi les solutions envisagées actuellement, la plus étudiée est la vectorisation. Celle-ci consiste en la combinaison d'un principe actif et d'un véhicule, appelé vecteur, de taille nanométrique, dans le but d'améliorer la pharmacocinétique et la biodistribution de la molécule active [21]. Ces vecteurs de taille nanométrique, capables d'amener une molécule active sur une cible thérapeutique donnée, portent le nom de nanomédicaments.

II.1. PRINCIPES ET INTÉRÊTS

Selon le principe actif à administrer, l'objectif principal de la vectorisation peut être d'augmenter sa solubilité ou sa stabilité chimique [22], de le protéger de la dégradation et/ou de l'élimination par l'organisme [23, 24], de cibler un organe ou un tissu particulier [25], et/ou de contrôler sa libération [26].

Le défi de la nanomédecine est double : transporter le médicament (vectoriser) à l'endroit précis où il sera utile (ciblage). Ceci est rendu possible premièrement grâce à la petite taille des nanomédicaments de l'ordre de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de nanomètres. Celle-ci permet au vecteur de circuler librement dans le sang et d'entrer dans les cellules par endocytose [27]. Le phénomène de multirésistance aux médicaments (MDR pour *Multiple Drug Resistance*), pouvant empêcher l'entrée cellulaire de la molécule active, est une des principales raisons de la faible efficacité des chimiothérapies anticancéreuses actuelles. Grâce à leur taille et leurs propriétés de surface différentes de celles du principe actif seul, les nanomédicaments sont capables de contourner ces mécanismes de résistance et d'augmenter l'entrée cellulaire de la molécule active [28, 29].

Un autre avantage est la capacité des nanomédicaments à protéger le principe actif de la dégradation, de l'excrétion, ou de la reconnaissance par le système immunitaire [30]. La molécule étant protégée à l'intérieur de la nanoparticule, son temps de demi-vie est ainsi augmenté.

Finalement, les nanomédicaments peuvent permettre le ciblage des tissus malades et la libération contrôlée du principe actif. Grâce à leur petite taille et/ou à la présence de ligands d'adressage, les nanoparticules présentent une accumulation préférentielle au niveau du site d'action [31]. Les nanomédicaments peuvent aussi répondre à un stimulus de l'environnement,

comme une baisse de pH ou la présence d'enzymes spécifiques, pour libérer sélectivement leur contenu au niveau de leur cible [32]. L'exposition des tissus sains aux molécules actives est ainsi limitée, ce qui permet de diminuer les effets indésirables et de concentrer la dose du principe actif au site d'action, maximisant ainsi son efficacité.

II.2. LES DIFFÉRENTS TYPES DE VECTEURS EN THÉRAPIE GÉNIQUE

Les vecteurs utilisés en thérapie génique peuvent être divisés en deux catégories : les vecteurs viraux et non viraux.

II.2.1. LES VECTEURS VIRAUX

Les vecteurs viraux sont connus pour leur pouvoir de transfection élevé, mais malheureusement aussi pour leurs effets indésirables, dont le principal est l'activation possible du système immunitaire.

En Europe, le Glybera[®] (alipogène tiparvovec) est le premier vecteur viral utilisé en thérapie génique à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché en 2012 par l'EMA (*European Medicines Agency*), et qui a été commercialisé début 2015. Le Glybera[®] consiste en une copie du gène humain codant pour la lipoprotéine lipase encapsulée dans le vecteur viral AAV1 (Virus Adéno-Associé de type 1). Il est indiqué dans le traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase, une pathologie très rare du métabolisme des triglycérides [33, 34]. Le Glybera[®] est le seul traitement disponible pour traiter cette pathologie, et malgré un coût de traitement de 1,1 million d'euros par patient, son utilisation est considérée comme profitable, car il améliore significativement la qualité de vie des patients souffrant de cette pathologie [35].

En Chine, un autre vecteur viral pour la thérapie génique est sur le marché depuis 2004. Ce nanovecteur, baptisé Gendicine[®], est un adénovirus recombinant contenant le gène suppresseur de tumeur p53. Il est indiqué dans le traitement de certains cancers épidermoïdes de la tête et du cou [36]. Ce traitement montre dans la plupart des cas une bonne efficacité antitumorale. Cependant, un nombre significatif de patients ne répondent pas au traitement et peu de preuves concernant son innocuité sont disponibles. Pour ces raisons, le Gendicine[®] n'est pas encore approuvé dans d'autres pays que la Chine [37].

D'après la plateforme ClinicalTrials.gov de l'*U.S. National Institutes of Health*, consultée en avril 2016, plus de 200 études cliniques concernant des vecteurs viraux sont actuellement en cours,

pouvant laisser croire à l'utilisation clinique future d'autres vecteurs viraux en thérapie génique [7]. La plupart de ces vecteurs, indiqués dans le traitement de pathologies variées comme divers types de cancers, l'hémophilie, l'hépatite C ou encore la maladie de Parkinson sont en étude clinique de phase I ou II. Parmi la petite dizaine d'études de phase III, le CG0070 a montré une efficacité significative dans le traitement du cancer invasif de la vessie, en plus d'un profil de sécurité acceptable. Les effets indésirables observés pendant l'étude, tels qu'une dysurie ou de la fatigue, étaient mineurs et transitoires [38].

II.2.2. LES VECTEURS NON VIRAUX

II.2.2.i. Généralités

Malgré ces premières autorisations de mise sur le marché pour des vecteurs viraux, beaucoup de chercheurs concentrent leurs intérêts sur les vecteurs non viraux. En effet, ceux-ci présentent moins d'effet immunogène, leur structure et leurs propriétés physico-chimiques sont facilement contrôlables et modulables, et leur production à grande échelle est généralement plus facile à mettre en oeuvre [17, 39, 40].

Parmi les vecteurs non viraux, les systèmes les plus fréquemment utilisés sont les vecteurs polymères et les vecteurs lipidiques.

II.2.2.ii. Les vecteurs lipidiques

Parmi les vecteurs lipidiques, les liposomes sont des nanoparticules sphériques, d'une taille pouvant varier de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Ils sont composés d'une ou plusieurs bicouches de lipides amphiphiles, autour d'un compartiment aqueux (Figure 3) [41]. Grâce à leur caractère à la fois hydrophile (cœur aqueux) et hydrophobe (bicouche lipidique), ils sont capables d'encapsuler une grande variété de molécules actives [42].

En fonction de la molécule à encapsuler, de la voie d'administration et de la cible, les caractéristiques physico-chimiques des liposomes peuvent être modulées en faisant varier la proportion et la nature des lipides ainsi que des adjuvants rentrant dans leur composition [43].

Les lipides les plus utilisés sont les phospholipides, composés d'une tête hydrophile comprenant un groupement phosphate et d'une queue hydrophobe (Figure 3). Une multitude de phospholipides existent en fonction de la nature de la tête et des chaînes hydrophobes. Par exemple, la tête des phosphatidylcholines (PC) est composée d'une choline et d'un groupe

phosphate, tandis que celle des phosphatidyléthanolamines (PE) est composée elle aussi d'un groupement phosphate, mais associé à une éthanolamine. Cette tête hydrophile est reliée, par un résidu glycérol, à deux chaînes carbonées. La nature de celles-ci peut varier en fonction de leur longueur et de la présence ou non d'insaturations [43, 44].

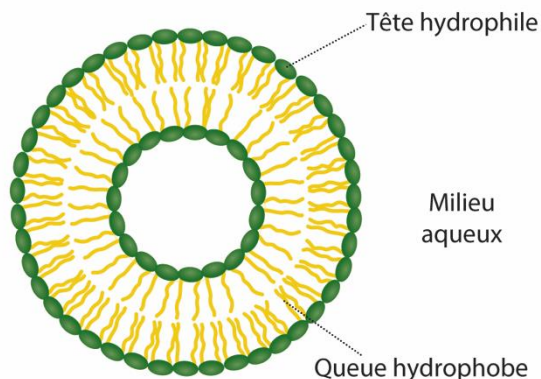


Figure 3. Représentation schématique d'un liposome, composé d'une bicouche de lipides amphiphiles, en milieu aqueux.

En plus des phospholipides, divers adjuvants peuvent être ajoutés à la composition des liposomes. Pour modifier la charge de surface, des lipides cationiques ou anioniques sont utilisés. On peut par exemple citer le DOTAP (1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane), lipide cationique souvent utilisé en thérapie génique pour augmenter l'interaction avec le matériel génétique chargé négativement [43]. Comme autre adjuvant, on peut citer le cholestérol, souvent employé pour s'insérer dans la bicouche lipidique afin d'en modifier la fluidité [45]. Enfin, un adjuvant bien connu est le polyéthylène glycol (PEG). Ce polymère hydrophile, greffé à un lipide afin de s'insérer dans la bicouche, permet de former une couronne hydrophile autour de la particule afin d'augmenter son temps de demi-vie [46].

II.2.2.iii. Les vecteurs polymères

Une autre classe de vecteurs non viraux sont les vecteurs polymères. Les systèmes colloïdaux à base de polymère présentent des structures variées, les plus connues étant les matrices, les capsules ou les micelles (Figure 4). L'encapsulation du principe actif dans ces systèmes peut être réalisée de plusieurs manières. Il peut être dispersé dans une matrice, dissous dans le cœur liquide de la nanoparticule, ou conjugué au polymère, grâce à des liaisons covalentes, électrostatiques ou hydrophobes [47].

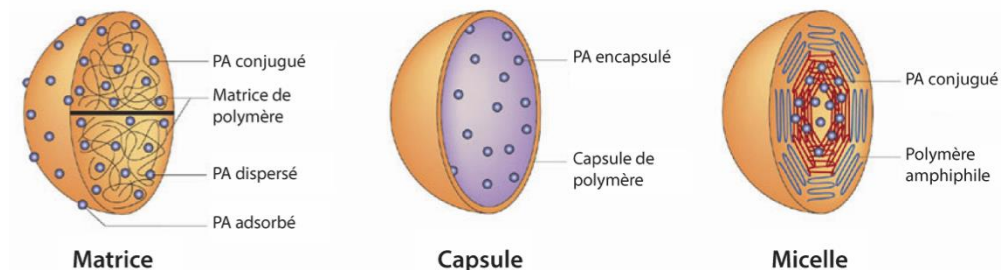


Figure 4. Représentation schématique de vecteurs polymères de type matrice, capsule et micelles, comprenant leurs différents modes d'encapsulation du principe actif (PA) (adapté de Griffiths *et al.* [48]).

Lors de la synthèse des polymères, ceux-ci peuvent être modifiés en faisant varier leur composition moléculaire, leur architecture (linéaire, ramifiée ou dendritique) et leur masse moléculaire. Toutes ces modifications donnent des possibilités infinies, conférant des propriétés physico-chimiques uniques à ces vecteurs [49].

Des exemples et descriptions de polymères utilisés en thérapie génique sont développés dans le chapitre de livre (point 2) [1].

Si les polymères présentent de nombreux avantages, ceux-ci ne sont toutefois pas dépourvus d'inconvénients. À l'heure actuelle, le polyéthylèneimine (PEI) est connu pour être le polymère le plus efficace pour la délivrance de matériel génétique *in vitro* et *in vivo* chez la souris [50, 51]. Cependant, sa toxicité élevée et sa faible biodégradabilité limitent son utilisation chez l'homme [52, 53]. D'autres polymères, d'une toxicité moindre, sont utilisés en recherche, comme les dendrimères de poly(amidoamine) (PAMAM) ou les poly(méthacrylate)s (PMAs). Ils sont aussi capables de former des systèmes de vectorisation efficaces, mais leur non-biodégradabilité présente un risque d'accumulation dans l'organisme [54-60]. Afin de mettre au point des vecteurs efficaces, peu toxiques et biodégradables, certains polyesters comme l'acide polylactique (PLA), la polycaprolactone (PCL) et l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) suscitent beaucoup d'intérêt. Leur biodégradation permet une libération prolongée du principe actif, et mène à la production de métabolites non toxiques [61-63]. Cependant, l'hydrolyse des liaisons ester mène à une acidification du milieu, pouvant être à l'origine d'une réaction inflammatoire et de dommages aux tissus environnants [64].

Les polymères étudiés dans le cadre de ce travail sont des polycarbonates aliphatiques (APC pour *Aliphatic Polycarbonate*), dont le squelette est formé d'une répétition de liaisons

carbonates (Figure 5). Les APC sont des polymères qui gagnent une attention croissante en raison de leur biodégradabilité, de leur biocompatibilité et de leur faible toxicité [65, 66]. La biodégradation des APC présente l'avantage de ne pas provoquer de diminution du pH de l'environnement, contrairement aux polyesters [67]. De plus, la chaîne principale aliphatique peut être combinée avec d'autres chaînes contenant des groupes fonctionnels. Ces fonctions permettent de modifier les caractéristiques du polymère comme la charge ionique, la lipophilie/hydrophilie et le pouvoir tampon [68].

De plus, ce type de polymère peut-être produit en respectant des principes de la « chimie verte », c'est-à-dire une chimie respectueuse de l'environnement. En effet, la synthèse d'APC est possible par la polymérisation par ouverture de cycle, sans présence d'un ion métallique [69], ou par polymérisation d'époxyde et de dioxyde de carbone, permettant au CO₂ d'être recyclé [66].

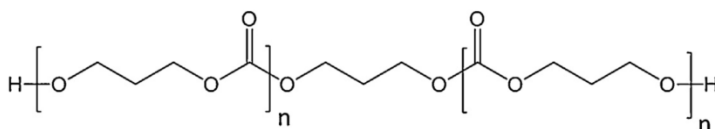


Figure 5. Structure de base d'un polycarbonate aliphatique (APC), synthétisé par la polymérisation par ouverture de cycle du monomère triméthylène carbonate (TMC) [69].

Pour ces raisons, les APC attirent une attention croissante en thérapie génique. Par exemple, Seow et ses collaborateurs ont développé des APC, fonctionnalisés par des fonctions amines, capables de délivrer le gène de la luciférase dans trois lignées cellulaires différentes. En plus de montrer une efficacité similaire à celle du PEI, ces polymères ne présentent pas de toxicité significative. Cependant, la taille des polyplexes formés est trop élevée pour envisager une administration par la voie intraveineuse (IV) [70].

L'équipe de Chen a aussi utilisé des APC, contenant un bloc de PEG. La charge positive est apportée par des oligoéthylènimines greffées sur la structure, afin de complexer de l'ADN. Avec un diamètre compris entre 100 et 200 nm, l'efficacité *in vitro* de ces polyplexes est jusqu'à 3 fois supérieure à celle du PEI [71].

Dans un article publié en 2011, l'équipe de Hedrick a comparé les caractéristiques physico-chimiques et l'efficacité de polyplexes formés avec un copolymère dibloc PEG-polycarbonate (fonctionnalisé par des fonctions amines) ou un tribloc polycarbonate-PEG-polycarbonate. Le

tribloc a montré une meilleure capacité à complexer une molécule d'ADN (plasmide), formant des polyplexes de taille plus petite et présentant une meilleure pénétration cellulaire. De plus, les cellules traitées par ces polyplexes montrent un plus grand niveau d'expression du gène codant pour la luciférase, et ce même en présence de sérum [72].

En 2012, l'équipe de Hedrick et Wender ont également utilisé des APC pour délivrer du siRNA. Un bloc du polymère était fonctionnalisé par des fonctions guanidines, afin d'augmenter l'entrée cellulaire, tandis que l'autre contenait un groupement hydrophobe. Les polyplexes formés avec certains de ces polymères ont montré une réelle efficacité, diminuant de 90 % l'expression de la protéine ciblée. Ces polyplexes présentent toutefois une taille trop élevée pour être administrés par la voie IV. Les auteurs ont également montré que l'ajout d'une chaîne de PEG à la structure du polymère diminuait drastiquement l'efficacité de ces vecteurs (Figure 6) [68].

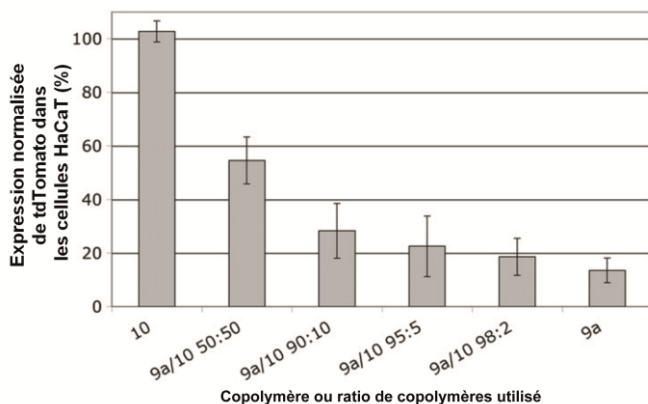


Figure 6. Réduction de l'expression de la protéine tdTomato dans les cellules HaCaT traitées par le copolymère polycarbonate PEGylé (10), le copolymère polycarbonate amphiphile (9a) ou des combinaisons des deux polymères. Le polymère amphiphile (9a) est capable de diminuer de 90 % l'expression de la protéine, tandis que l'efficacité du polymère PEGylé (10) est nulle. Quant à l'efficacité de la combinaison des deux polymères, celle-ci diminue en fonction de la proportion de polymère PEGylé [68].

L'utilisation des polymères APC en tant que vecteurs non viraux est récente et prometteuse. Pour ces raisons, notre travail se focalisera sur ce type de polymères, dans le but de développer des vecteurs de siRNA actifs après une administration par la voie IV.

II.2.2.iv. Les vecteurs non viraux utilisés en clinique

Les vecteurs non viraux sont actuellement utilisés pour l'administration de diverses molécules, principalement en oncologie. En effet, la plupart des chimiothérapies conventionnelles non vectorisées présentent de nombreux effets indésirables dus à un faible index thérapeutique, c'est-à-dire une toxicité importante aux doses proches de celles utilisées en clinique. Les agents chimiothérapeutiques peuvent être formulés sous forme de nanomédicament afin d'augmenter leur accumulation sélective au site de la tumeur et diminuer l'exposition des tissus sains. Aujourd'hui, en 2016, il existe plusieurs nanomédicaments, acceptés par la FDA et/ou l'EMA, indiqués notamment dans le traitement du cancer [31, 32, 73-76]. Ceux-ci sont détaillés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Nanomédicaments autorisés par la FDA et/ou l'EMA, en 2016, et indiqués dans le traitement du cancer [31, 32, 73-76].

Nom déposé	Molécule	Vecteur utilisé	Indications
Caelyx [®] , Doxil [®] , LipoDox [®]	Doxorubicine	Liposome PEGylé	Sarcome de Kaposi, myélome multiple, cancer de l'ovaire
Myocet [®]	Doxorubicine	Liposome non PEGylé	Cancer du sein métastatique
DaunoXome [®]	Daunorubicine	Liposome non PEGylé	Sarcome de Kaposi
DepoCyt [®]	Cytarabine	Liposome non PEGylé	Méningite lymphomateuse
Mepact [®]	Mifarmutide	Liposome non PEGylé	Ostéosarcome non métastatique
Marqibo [®] , Onco TCS [®]	Vincristine	Liposome non PEGylé	Leucémie aiguë lymphoblastique
Abraxane [®]	Paclitaxel	Albumine	Cancer du sein métastatique
Opaxio [®]	Paclitaxel	Nanoparticules de polyglutamate	Cancer du poumon non à petites cellules
Oncospar [®]	L-asparaginase	Monométhoxypolyéthylène glycol	Leucémie aiguë lymphoblastique

L'utilisation clinique de ces vecteurs permet d'améliorer la tolérance de la chimiothérapie chez les patients. Par exemple, l'administration de la doxorubicine grâce à des liposomes recouverts de PEG (Caelyx[®], Doxil[®], LipoDox[®]) permet de diminuer sa toxicité cardiaque. L'accumulation des liposomes au niveau de la tumeur devrait aussi avoir un effet favorable sur l'efficacité. Cependant, une étude récente a montré que l'efficacité thérapeutique du Caelyx[®] n'était pas statistiquement supérieure à celle d'un traitement par la doxorubicine administrée seule [77].

Le cas du Caelyx[®] n'est toutefois pas une généralité. En effet, l'Abraxane[®] (paclitaxel lié à de l'albumine) montre une plus faible toxicité ainsi qu'une efficacité supérieure à celle d'une dose équivalente de paclitaxel utilisé seul [78].

II.2.2.v. Intérêt des vecteurs de siRNA

L'intérêt d'associer un vecteur à du siRNA est donc double. D'une part, la vectorisation permet de cibler le site pathologique et ainsi diminuer les effets indésirables sur les tissus sains [13]. D'autre part, le siRNA permet, par son mécanisme d'action, d'être spécifique d'une protéine, et donc de réduire les effets indésirables causés par une activité non spécifique des molécules à large spectre. Associés au siRNA, les vecteurs non viraux portent respectivement les noms de lipoplexes pour les liposomes et de polyplexes pour les polymères [43].

Pour le moment, il n'existe aucun traitement à base de polyplexes ou de lipoplexes sur le marché. Leur efficacité n'a pas encore atteint celle des vecteurs viraux. Cependant, de nombreuses études cliniques ont eu lieu récemment ou sont en cours. En avril 2016, la plateforme ClinicalTrials.gov de l'*U.S. National Institutes of Health* dénombre plus de 20 études cliniques, dont la première date de 2005, concernant l'administration de siRNA grâce à des vecteurs non viraux pour diverses pathologies comme l'hypercholestérolémie, l'hépatite B ou l'amyloïdose de la transthyréline [7, 51]. Cette dernière pathologie est une neuropathie causée par une mutation du gène codant pour la transthyréline (TTR), entraînant des dépôts d'amylose principalement au niveau cardiaque. Le patisiran, actuellement en étude clinique de phase III, contient un siRNA ciblant l'ARNm du TTR, encapsulé dans une nanoparticule lipidique. Les résultats de la phase II ayant montré une diminution significative du taux de TTR dans la circulation, de type naturel et muté, apportant des bénéfices cliniques significatifs [79].

Les pathologies cancéreuses sont celles pour lesquelles la majorité des polyplexes et lipoplexes sont étudiés. En effet, la plupart des études cliniques de vecteurs non viraux à base de siRNA,

INTRODUCTION

terminées ou en cours, concernent le traitement du cancer. Celles-ci sont citées dans le Tableau 2 [7, 13, 51, 80, 81].

Tableau 2. Études cliniques récentes de vecteurs non viraux à base de siRNA dans le cadre du traitement du cancer [7, 13, 80, 81].

Entreprise	Nom	Cible	Vecteur	Phase clinique	Indications
Calando Pharmaceuticals	CALAA-01	RRM2	Polymère	Phase I interrompue	Tumeurs solides
Mima Therapeutics	MRX34	miR-34	Liposome	Phase I en cours	Carcinome hépatocellulaire
M.D. Anderson Cancer Center	siRNA-EPHA2-DOPC	EPHA2	Liposome	Phase I en cours	Cancer avancé
Alnylam Pharmaceuticals	ALN-VSP	VEGFA et KSP	Liposome	Phase I terminée	Tumeurs solides
Silence Therapeutics	Atu027	PKN3	Liposome	Phase I terminée	Tumeurs solides
Arbutus Biopharma	TKM-PLK1	PLK1	Liposome	Phase II en cours	Carcinome hépatocellulaire
ProNAi Therapeutics	PNT2258	BCL2	Liposome	Phase II en cours	Tumeurs solides avancées
Silenseed	siG12D LODER	KRAS	Polymère	Phase II en cours	Cancer du pancréas
Senesco Technologies	SNS01-T	eLF5A	Polymère	Phase II en cours	Myélome multiple
Dicerna Pharmaceuticals	DCR-MYC	MYC	Liposome	Phase II en cours	Carcinome hépatocellulaire

Aucune de ces études visant le traitement du cancer n'a pour le moment atteint la phase III. Les résultats actuels sont cependant prometteurs. Par exemple, la Polo-Like Kinase I (PLK1), une protéine essentielle à la division cellulaire, voit son expression augmentée dans de nombreux cancers. L'extinction de cette protéine dans les cellules cancéreuses induit l'apoptose et la mort cellulaire. Le TKM-PLK1, un liposome d'environ 80 nm de diamètre contenant du siRNA ciblant la PLK-1, est indiqué dans les carcinomes hépatocellulaires. En étude clinique, il a montré un effet thérapeutique bénéfique chez 4 des 9 patients [80].

III. LES VECTEURS POLYMÈRES DE siRNA POUR L'ADMINISTRATION INTRA VEINEUSE

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement au développement d'un vecteur polymère, de type APC, destiné à l'administration IV de siRNA pour le traitement des tumeurs solides.

III.1. GÉNÉRALITÉS

Généralement, le siRNA se lie au vecteur polymère via des liaisons électrostatiques pour former spontanément des nanoparticules appelées polyplexes (Figure 7). Les fonctions cationiques présentes sur la structure du vecteur forment des liaisons ioniques avec les groupements phosphates anioniques du siRNA [82]. Récemment, en plus des vecteurs cationiques, des vecteurs amphiphiles, neutres, voire anioniques, ont commencé à intéresser les chercheurs [83-87].

Si la nature et la masse moléculaire du polymère influencent toutes les deux la formation et les caractéristiques des polyplexes, d'autres paramètres ont aussi une influence sur leurs caractéristiques physico-chimiques.



Figure 7. Formation des polyplexes par interactions électrostatiques.

Le rapport entre la quantité de polymère et de siRNA modifie fortement les caractéristiques du polyplexe. Ce rapport, appelé « rapport N/P » correspond à la proportion entre le nombre de fonctions amines (N pour *nitrogen*), positivement ionisables, présentes sur la structure du polymère, et le nombre de fonctions phosphates (P), chargées négativement, présentes sur l'acide nucléique [88]. Le rapport polymère/siRNA peut aussi être exprimé en rapport molaire ou de masse [89].

La nature du milieu dans lequel les polyplexes sont formés (pH, force ionique, nature des constituants) joue également un rôle dans la formation de la nanoparticule et influence ses propriétés physico-chimiques. Ainsi, le pH du milieu modifie le degré d'ionisation des fonctions pH-dépendantes du polymère. Les fonctions dont le pKa est supérieur à 8 sont utiles pour la complexation avec le siRNA, car elles seront chargées positivement à une valeur de pH neutre. Les fonctions dont le pKa est inférieur à 7 sont quant à elles, utiles pour la libération des polyplexes de l'endosome, comme cela sera décrit au paragraphe **III.5**. La force ionique a aussi une influence sur la conformation et la stabilité des polyplexes. Par exemple, une faible concentration en composés ioniques dans le milieu (< 10 mM) tend à augmenter la stabilité des polyplexes [90]. La taille et la charge de surface des nanoparticules varient également selon la concentration et la nature de tampon. Par exemple, Troiber et ses collaborateurs ont montré l'influence de différents tampons sur la taille de trois types de polyplexes. Parmi ces polyplexes, deux ont montré une taille inférieure dans une solution à 10 mM en NaCl en comparaison à une solution à 150 mM. Par contre, la troisième formulation a étonnamment montré l'inverse, avec un diamètre deux fois plus important dans la solution la moins concentrée [91].

Habituellement, afin d'obtenir des caractéristiques physico-chimiques et une stabilité optimales, les polyplexes sont préparés dans des tampons faiblement concentrés, à pH 7,4, et dont l'osmolarité est ajustée au moyen de sucres, tels le glucose, le tréhalose ou le mannitol [92].

III.2. LES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES ESSENTIELS DES POLYPLEXES

Lors de la formulation de polyplexes, la caractérisation physico-chimique est une étape cruciale qui permettra en partie de prédire la compatibilité de ceux-ci avec une future utilisation *in vivo*. En effet, afin de pouvoir être administrés *in vivo*, les polyplexes doivent répondre à différentes caractéristiques physico-chimiques détaillées ci-dessous.

III.2.1. LE NIVEAU DE COMPLEXATION DU siRNA

La première caractéristique essentielle est le degré de complexation du siRNA avec le polymère. Comme le siRNA est complexé grâce aux groupements fonctionnels cationiques présents sur la structure du polymère, la nature de ces fonctions, la densité de charge et la masse moléculaire du polymère font partie des principaux paramètres influençant la complexation du siRNA. Une densité de charge et une masse moléculaire élevées sont des paramètres favorables à la complexation [93]. Des polymères de faible masse moléculaire limitent la cohésion des polyplexes et le niveau de complexation du siRNA [94].

Ce degré de complexation peut être évalué en utilisant différentes techniques. La plus fréquemment utilisée est l'électrophorèse sur gel d'agarose, qui est une méthode semi-quantitative. [95, 96]. L'incorporation du siRNA peut aussi être mesurée plus précisément en quantifiant le siRNA libre en solution dans une suspension de polyplexes. Différents types de sondes d'acides nucléiques sont capables de réagir avec le siRNA non complexé, grâce à leur propriété d'agent intercalant, comme le RiboGreen® ou le SYBR Gold® [97, 98].

III.2.2. LA TAILLE

Afin d'atteindre le site de la tumeur, la taille des polyplexes est un paramètre essentiel à prendre en compte. Il a été démontré que la taille optimale pour des nanoparticules injectées par la voie IV doit être comprise entre 50 et 300 nm [99, 100].

Cette taille leur permet d'éviter leur élimination de l'organisme. En effet, les plus petites particules sont filtrées par le glomérule et excrétées par la voie urinaire [100]. Les plus grosses particules sont par contre capturées par le foie et phagocytées par les cellules de Kupffer [101].

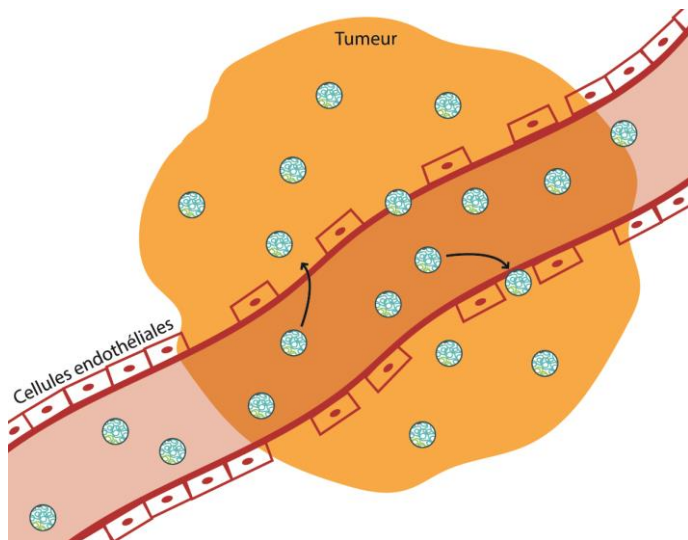


Figure 8. Représentation schématique de l'effet EPR : les tumeurs solides possèdent généralement un endothélium fenestré, caractérisé par de larges fenestrations, de 200 à 1 μm , permettant le passage et l'accumulation au niveau tumoral des nanoparticules.

De plus, les nanoparticules comprises entre 50 et 300 nm peuvent s'accumuler préférentiellement au niveau tumoral grâce à l'effet EPR (pour *Enhanced Permeability and*

Retention) (Figure 8). Contrairement aux tissus sains où l'endothélium vasculaire est continu, les tissus cancéreux présentent quant à eux, une perméabilité vasculaire accrue en raison de réactions inflammatoires caractérisées par l'arrivée de macrophages et la libération de différentes cytokines. En effet, les tumeurs solides possèdent généralement un endothélium fenestré, caractérisé par de larges fenestrations de 200 à 1 μm , permettant le passage et l'accumulation au niveau tumoral des nanoparticules de taille optimale [102, 103]. L'effet EPR sera davantage développé au point **III.3.3.a**.

De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour mesurer le diamètre moyen des polyplexes. La méthode la plus facile à mettre en œuvre et la plus fréquemment utilisée est la Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering* ou PCS pour *Photon Correlation Spectroscopy*), qui utilise le mouvement brownien des nanoparticules en suspension pour déterminer leur diamètre hydrodynamique moyen [100, 104].

Une autre méthode est la *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) aussi appelée *Single Particle Tracking* (SPT). Un des avantages de la NTA, par rapport à la DLS, est qu'elle permet l'utilisation de nanoparticules fluorescentes, qui seront les seules à être détectées contrairement aux autres particules présentes dans le milieu. Cette technique est très utile pour mesurer la taille de polyplexes dans des milieux complexes, tels que les milieux physiologiques [105, 106].

La méthode la plus précise pour la détermination du diamètre des nanoparticules est la microscopie électronique, comprenant la microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy*) et la microscopie électronique à transmission (MET ou TEM pour *Transmission Electron Microscopy*). L'avantage de ces techniques est la possibilité d'observer directement l'échantillon et d'obtenir des données précises sur la taille et la morphologie des nanoparticules [100]. Le diamètre observé par microscopie électronique est généralement plus petit que le diamètre hydrodynamique obtenu par DLS ou NTA. En effet, ce dernier correspond au diamètre de la particule et de la fine couche d'ions provenant de la solution, adhérant à la surface de la particule. Ces techniques de microscopie sont toutefois plus coûteuses et plus difficiles à mettre en œuvre que les technologies de DLS ou NTA.

Ces techniques sont développées plus en détail au point **4.2** du chapitre de livre [1].

III.2.3. LA CHARGE DE SURFACE

La charge de surface (potentiel zêta ou potentiel ζ) est un paramètre qui influence de nombreux comportements des nanoparticules tels que leur interaction avec les membranes plasmiques dans le mécanisme d'endocytose, leur interaction avec les constituants du sang et leur stabilité colloïdale en suspension.

Il est généralement reconnu que pour pouvoir interagir avec les constituants des membranes cellulaires chargés négativement (tels que les glycosaminoglycanes, les protéoglycanes et les phospholipides), les polyplexes doivent idéalement posséder un potentiel zêta positif [107-109]. Toutefois, plusieurs auteurs ont récemment montré une pénétration cellulaire élevée pour des nanoparticules chargées négativement [87, 110]. Par exemple, les travaux de l'équipe de Kapoor ont montré que l'endocytose de lipoplexes anioniques, composés de DOPG (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, lipide anionique) et de DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, lipide zwitterionique) pouvait être plus élevée que celle d'un agent de transfection cationique commercial, la Lipofectamine 2000[®], remettant en question la nécessité de la charge positive [87].

La charge de surface peut également influencer l'interaction avec les constituants du sang et la toxicité des nanoparticules. Il est bien connu que les nanoparticules chargées positivement peuvent subir une agrégation avec les protéines plasmatiques chargées négativement, telles que l'albumine ou des protéines du système du complément. Les polyplexes cationiques peuvent également interagir avec les globules rouges. Ainsi, des polyplexes de potentiel zêta fortement positif pourraient provoquer une hémolyse ou l'agrégation des érythrocytes [111]. Afin d'éviter des interactions non désirées, la charge positive des polyplexes doit être réduite ou masquée, par exemple grâce à l'utilisation de chaînes de PEG. Ce point sera discuté en détail dans le paragraphe **III.3.1.**

Enfin, dans une dispersion colloïdale de polyplexes, le potentiel zêta influence le degré de répulsion entre les particules de même charge. Si les particules possèdent une charge de surface importante, la répulsion sera forte. Des nanoparticules faiblement chargées ont tendance à avoir une plus faible stabilité et un risque élevé d'agrégation. En général, une dispersion colloïdale est considérée comme stable si le potentiel zêta des particules est supérieur à +30 mV ou inférieur à -30 mV [112].

La charge de surface optimale des polyplexes est donc un compromis entre, d'un côté, les avantages d'une surface cationique qui permet d'augmenter la stabilité de la dispersion colloïdale et l'interaction avec les membranes cellulaires, et d'un autre côté, le risque de toxicité et d'agrégation des protéines plasmatiques causées par une charge trop élevée.

Pour mesurer le potentiel zêta, la technique la plus utilisée est la Vélocimétrie Laser Doppler (LDV pour *Laser Doppler Velocimetry*). Cette technique est similaire à la DLS utilisée pour la mesure de la taille, mais avec un champ électrique appliqué à l'échantillon. La lumière diffusée produit un signal, dont l'intensité varie avec la vitesse des particules. Cette vitesse, qui peut être mesurée, dépend de quatre facteurs: le gradient de voltage, la constante diélectrique du liquide, la viscosité du milieu, et le potentiel zêta.

III.2.4. LA STABILITÉ

En plus de l'effet de la charge de surface, la stabilité colloïdale des polyplexes peut être améliorée en créant un encombrement stérique autour des particules au moyen, par exemple, d'un polymère hydrophile comme le PEG. En effet, l'équipe de Steele a montré que des polyplexes d'oligoéthylènimine d'une taille de 200 nm s'agrègent rapidement pour former des particules de presque 1000 nm. L'addition de PEG à la surface de ces polyplexes leur permet de conserver une taille proche de 200 nm pendant au moins deux heures [90].

Afin de garantir une conservation à plus long terme, comme l'exige le développement d'un médicament, les polyplexes doivent être conservés sous forme sèche. La méthode de dessiccation la plus adaptée aux dispersions colloïdales est la lyophilisation [113, 114]. Cependant, cette technique implique des facteurs de stress pour les polyplexes. En effet, le gel et la sublimation de l'eau peuvent causer des dommages et ainsi dénaturer les nanoparticules. Afin d'éviter cette dénaturation, un cryoprotecteur doit être utilisé. Celui-ci est généralement un sucre, comme le glucose, le tréhalose ou le mannitol. Ces cryoprotecteurs vont protéger la suspension de polyplexes lors de la lyophilisation en formant une matrice vitreuse autour des nanoparticules [115]. La stabilité des polyplexes peut être optimisée en sélectionnant les conditions de lyophilisation, le cryoprotecteur (sa nature et sa concentration), et les conditions de stockage telles que la température et l'humidité [116]. Les échantillons lyophilisés peuvent ensuite être réhydratés extemporanément, juste avant leur administration.

III.3. LES CONTRAINTES LIÉES À L'ADMINISTRATION IV DE POLYPLEXES

Afin de permettre une accumulation au niveau du tissu tumoral grâce à l'effet EPR, les polyplexes doivent avoir une demi-vie suffisante dans le compartiment sanguin. Un temps de séjour prolongé dans le sang augmente le nombre de passages au niveau tumoral et donc les chances de s'y accumuler [117]. Une fois dans la circulation générale, les polyplexes sont en contact avec de nombreux constituants du sang dont certains sont impliqués dans l'élimination des substances exogènes. Différentes stratégies existent afin d'éviter la dégradation et l'élimination des polyplexes et ainsi augmenter leur temps de demi-vie.

III.3.1. L'ADSORPTION DES PROTÉINES PLASMATIQUES

a. La couronne de protéines

Au contact des éléments sanguins, on peut observer une adsorption des protéines plasmatiques, chargées négativement, à la surface des nanoparticules positives. Les polyplexes cationiques sont couverts par une couche dense de protéines, principalement composée d'albumine [118], appelée couronne de protéines (*protein corona* en anglais). Celle-ci est formée d'une couche de protéines adhérentes et d'une couche plus diffuse (Figure 9) [119, 120].

La formation de cette couronne est un obstacle important lors de l'administration des polyplexes. Tout d'abord, les protéines peuvent entrer en compétition avec la complexation du siRNA au polymère et entraîner sa libération prématurée dans le sang. Deuxièmement, la couronne de protéines peut modifier la taille et provoquer une agrégation en particules trop grandes pour s'accumuler de façon optimale au niveau de la tumeur grâce à l'effet EPR [100, 102]. De plus, cette couronne de protéines peut modifier les propriétés de surface des nanoparticules. La surface de la nanoparticule étant masquée, il est fréquent d'observer une plus faible interaction avec les membranes plasmiques, provoquant une diminution de la pénétration cellulaire et de la libération de l'endosome, étapes cruciales à l'efficacité des polyplexes [121, 122]. Par exemple, Dakwar et ses collaborateurs ont montré que l'entrée cellulaire de liposomes cationiques en présence de liquide péritonéal, riche en protéines, était quasi inexistante, alors que ces mêmes liposomes sont capables d'être endocytés par les cellules cultivées dans un milieu exempt de protéines [123].

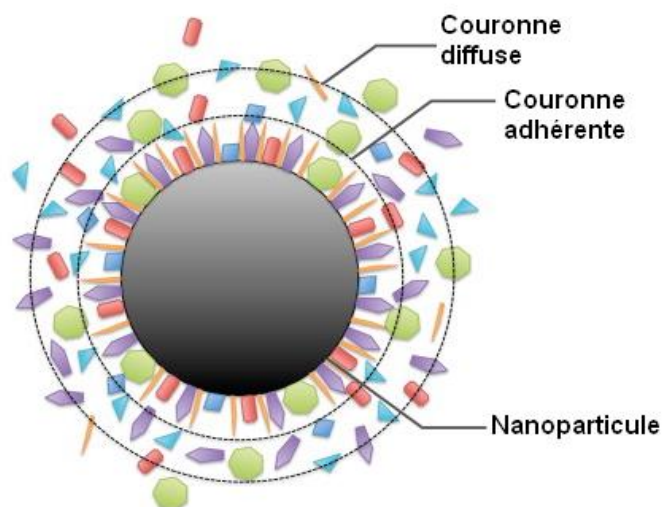


Figure 9. Représentation schématique de la couronne de protéines d'une nanoparticule cationique, composée d'une couche adhérente, fortement liée à la nanoparticule par des liaisons ioniques, et d'une couche plus diffuse (adapté de Wolfram *et al.* [120]).

Parmi ces protéines, certaines sont impliquées directement dans la reconnaissance et la dégradation des corps étrangers. Parmi celles-ci, les immunoglobulines, comme les IgM et les IgG, peuvent s'adsorber à la surface du polyplexe et provoquer une réaction immunitaire. Les facteurs du complément (C3, C4 et C5) sont également capables de se fixer à la surface de la nanoparticule, et activer ensuite le système du complément, impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des substances exogènes [30, 124]. Une fois que les polyplexes ont adsorbé à leur surface des immunoglobulines et/ou les facteurs du complément, ils deviennent reconnaissables par les cellules phagocytaires en tant que matériel exogène. Les monocytes et macrophages du système réticulo-endothélial procèdent à leur phagocytose conduisant à leur dégradation [125, 126].

Les caractéristiques physico-chimiques des polyplexes, comme leur taille, leur forme, leur charge de surface, ou leur déformabilité, influencent la fixation des protéines plasmatiques [127, 128]. Par exemple, les travaux de Tenzer ont montré des différences significatives dans la composition de la couronne de protéines entre des nanoparticules de silice de 20, 30 ou 100 nm de diamètre [128].

b. La PEGylation

Afin de limiter l'adsorption des protéines plasmatiques et la reconnaissance par le système immunitaire, différentes stratégies peuvent être envisagées. La méthode la plus fréquemment utilisée et la plus étudiée actuellement est l'utilisation du polymère hydrophile PEG. Le PEG est un polymère non toxique constitué de monomères d'oxyde d'éthylène. Il est approuvé par la FDA pour un usage chez l'homme [129]. Lorsqu'elles sont fixées sur le polyplexe, les chaînes de PEG lient les molécules d'eau à la surface de la nanoparticule. Cette couche hydratée réduit les interactions avec les protéines plasmatiques, en fonction de la densité de la couverture, de la conformation et de la masse moléculaire des chaînes de PEG. Ces nanoparticules dites « PEGylées » sont considérées comme furtives (*stealth* en anglais) parce qu'elles deviennent invisibles pour le système immunitaire (Figure 10) [117]. En outre, comme discuté plus haut, la PEGylation diminue la tendance des polyplexes à s'agréger en raison de l'augmentation des répulsions stériques entre les nanoparticules. La stabilité est donc aussi augmentée [130].

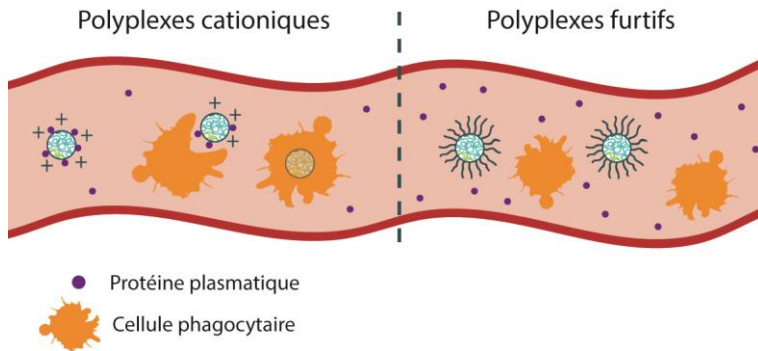


Figure 10. Comparaison de la stabilité dans le sang entre les polyplexes cationiques et les polyplexes furtifs.

Il existe différentes méthodes permettant de greffer les chaînes de PEG à la surface des nanoparticules. Le polymère peut être synthétisé de manière à contenir une chaîne de PEG. La chaîne hydrophile de PEG sera alors liée de façon covalente à une extrémité du polymère au cours de la synthèse [72, 88]. Si ce polymère est utilisé seul, cette méthode apporte une couche de PEG de densité importante et, par conséquent, une stabilité élevée [131].

D'autres méthodes impliquant la PEGylation covalente des nanoparticules déjà formées comprennent par exemple le greffage d'une chaîne de PEG directement sur un groupe réactif présent à la surface du polyplexe, comme un groupe amine [132] ou thiol [133]. Cette méthode de greffage présente plusieurs inconvénients, comme la nécessité de connaître le nombre de

groupes réactifs placés à la surface de la nanoparticule, les étapes de purification après la PEGylation, ainsi que la densité de PEG limitée par l'encombrement stérique provoqué par les chaînes de PEG nouvellement greffées [131].

Une fixation non covalente du PEG à la surface du polyplexe peut être réalisée en exploitant des interactions hydrophobes ou électrostatiques, en fonction des propriétés physico-chimiques de la surface des nanoparticules. Pour des surfaces hydrophobes, des poloxamères (copolymères triblocs de PEG et poly(propylène glycol) (PPG)) peuvent être utilisés. Le bloc hydrophobe PPG sert de point d'ancrage sur la surface du polyplexe aux deux blocs PEG hydrophiles [134]. Il est également possible d'ajouter des molécules amphiphiles contenant une chaîne de PEG lors de la préparation des polyplexes, comme le stéarate de PEG ou le DSPE-PEG [135]. Les copolymères à deux blocs tels que PLL-PEG sont, quant à eux, capables de s'ancrer aux polyplexes ayant une surface hydrophile [136]. Cette méthode de fixation non covalente est simple et pratique, mais la faible stabilité de l'ancrage, la densité limitée de PEG et les étapes de purification supplémentaires nécessaires sont les principaux inconvénients.

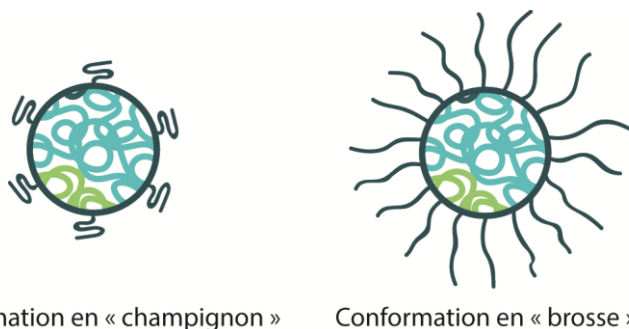


Figure 11. Conformation de la couronne de PEG en « champignon » ou en « brosse ».

L'interaction des polyplexes PEGylés avec les protéines plasmatiques dépend de la longueur et de la densité de greffage des chaînes de PEG. Ces deux caractéristiques entraînent des conformations différentes du PEG à la surface des particules. À faible densité, les chaînes de PEG adoptent une conformation en forme de « champignon » (Figure 11). Cette conformation est obtenue lorsque la distance entre deux molécules de PEG, placées à la surface du polyplexe, est plus grande que la longueur d'une chaîne de PEG. Dans la conformation en « brosse », les chaînes de PEG sont repliées sur elles-mêmes à la surface des nanoparticules et possèdent un degré élevé de mobilité. Cette conformation ne suffit pas à masquer totalement la surface des polyplexes et ainsi une adsorption partielle des protéines est

encore possible. Avec l'augmentation de la densité à la surface des nanoparticules, les chaînes de PEG sont plus proches les unes des autres, ce qui réduit leur mobilité. Dans ce cas, les molécules de PEG sont disposées dans une conformation en « brosse », caractérisée par des chaînes complètement étendues à partir de la surface. Cette conformation permet un revêtement dense, ce qui diminue considérablement l'interaction avec les constituants des milieux physiologiques [137].

La masse moléculaire de la chaîne de PEG, qui détermine sa longueur, est également un paramètre crucial dans la formulation de polyplexes furtifs. Selon la littérature, les nanoparticules PEGylées possèdent des propriétés suffisamment furtives avec des chaînes d'une masse moléculaire supérieure à 2 kDa. La diminution de furtivité due aux courtes chaînes de PEG serait causée par la diminution de leur flexibilité [134].

c. Le dilemme du PEG et les alternatives à la PEGylation

Alors que la PEGylation augmente le temps de demi-vie des polyplexes dans la circulation sanguine et donc l'accumulation au niveau de la tumeur [138], le PEG peut aussi diminuer la pénétration cellulaire et la libération de l'endosome, conduisant au final à une perte d'efficacité. Ce problème est connu sous le nom de « dilemme du PEG » (*PEG dilemma* en anglais) [139, 140]. En effet, la charge superficielle positive des polyplexes est masquée par l'addition des chaînes de PEG, avec pour conséquence une réduction de l'interaction des nanoparticules avec les protéines plasmatiques, mais aussi avec les membranes des cellules cibles.

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour augmenter l'interaction cellulaire de polyplexes PEGylés, comme l'utilisation de nanoparticules « intelligentes » qui conservent une PEGylation stable dans le compartiment sanguin, mais qui une fois arrivées au niveau des cellules cibles, permettent une interaction élevée avec les membranes plasmiques grâce à une exposition des charges cationiques ou des ligands d'adressages [121, 141]. Cette stratégie consiste à utiliser des liaisons chimiques entre le PEG et la nanoparticule qui pourront être clivées grâce à un stimulus présent spécifiquement dans l'environnement tumoral. En effet, le tissu tumoral peut, par exemple, exprimer des niveaux élevés de métalloprotéinase matricielle (MMP). Si le PEG est lié au polyplexe par un peptide clivable par la MMP, le PEG pourra se dissocier de la nanoparticule lorsqu'elle atteindra la tumeur, et l'absorption cellulaire pourra être augmentée (Figure 12) [142].

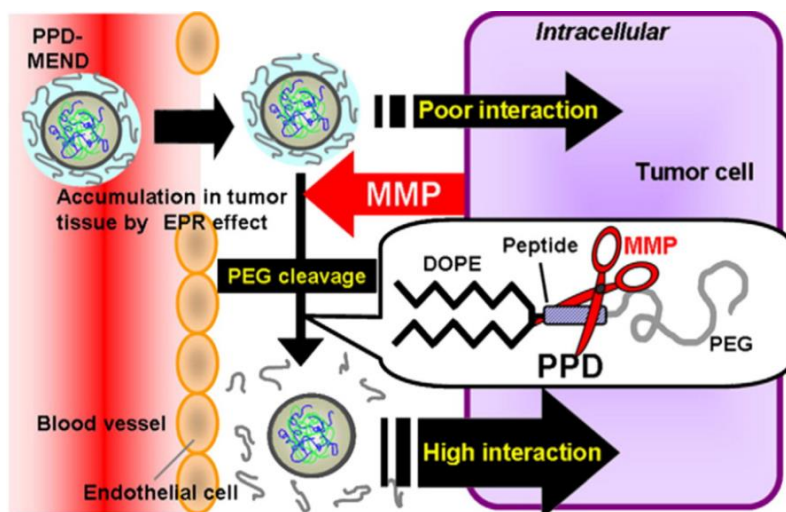


Figure 12. Représentation schématique de l'utilisation d'une chaîne de PEG reliée à la nanoparticule par un peptide clivable en présence de MMP [143].

L'environnement de la tumeur peut aussi présenter un pH plus acide que le pH physiologique. Cette acidité tumorale peut aussi être exploitée pour libérer le PEG de la surface des polyplexes, en utilisant par exemple une liaison hydrazone sensible au pH [144].

Une autre stratégie consiste à greffer des ligands d'adressage à l'extrémité des chaînes de PEG, par exemple la transferrine, des facteurs de croissance, etc. La présence de récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales peut augmenter l'endocytose spécifique de ces nanoparticules [143, 145, 146]. Cette stratégie sera davantage discutée dans la section **III.3.3.b.**

Un autre inconvénient de la PEGylation est le phénomène de clairance sanguine accélérée (ABC pour *Accelerated Blood Clearance phenomenon*). Le phénomène ABC peut être observé dans le cadre d'administrations successives de PEG. En effet, une modification inattendue de la pharmacocinétique peut se produire lors de la deuxième injection de nanodispersions PEGylées. Les polyplexes peuvent être rapidement éliminés de la circulation sanguine et s'accumuler dans le foie. Ce phénomène est dû à la production par la rate d'anticorps IgM anti-PEG par les lymphocytes B de la zone marginale splénique, après la première injection PEG. Lors de la seconde injection, l'IgM anti-PEG reconnaîtra et se liera au PEG du polyplexe, ce qui provoquera l'activation du système du complément, conduisant à la phagocytose par les macrophages hépatiques du système réticulo-endothélial [147, 148].

Il existe des alternatives potentielles à la PEGylation ayant pour but d'obtenir des nanoparticules furtives alliant les avantages du PEG tout en évitant ses effets indésirables.

On peut citer comme exemple l'utilisation de nanoparticules anioniques, subissant une conversion de charge en réponse à des modifications de l'environnement. Dans leurs travaux, l'équipe de Kogure a greffé un peptide anionique à la surface de leurs nanoparticules, devenant cationique grâce à la protonation des histidines en milieu tumoral légèrement acide (Figure 13). Les résultats montrent une entrée cellulaire significativement plus élevée à pH 6,5 qu'à pH 7,4 [140].

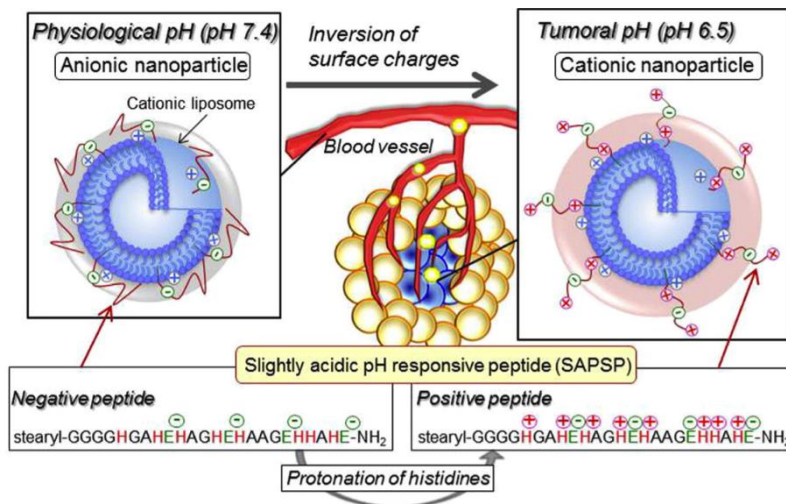


Figure 13. Exemple de nanoparticules anioniques à pH physiologique, mais devenant cationiques en milieu tumoral légèrement acide grâce à la protonation des histidines [140].

D'autres polymères que le PEG peuvent aussi être utilisés pour modifier la surface des nanoparticules. Parmi ceux-ci, on peut citer l'acide hyaluronique, un polysaccharide naturel de la matrice extracellulaire des vertébrés [149, 150]. Grâce à ses propriétés anioniques et non immunogènes, l'acide hyaluronique peut se lier de façon électrostatique aux polyplexes cationiques et former une couronne stérique autour de la nanoparticule, augmentant le temps de demi-vie [149]. De plus, le récepteur CD44, liant entre autres l'acide hyaluronique, est surexprimé au niveau de nombreuses cellules tumorales, donnant aussi à ce polymère un rôle de ligand d'adressage spécifique [151]. Pour ces raisons, Ravar et ses collègues ont lié électrostatiquement de l'acide hyaluronique à la surface de liposomes. Ces liposomes ont

montré une stabilité *in vivo* suffisante pour permettre une accumulation au site de la tumeur [150].

III.3.2. LA DÉGRADATION PAR LES NUCLÉASES

Une des raisons pour lesquelles le siRNA ne peut pas être administré seul est la présence de nucléases dans le sang. Une fois qu'il est incorporé dans des polyplexes, les nucléases ne peuvent pas accéder au siRNA ainsi protégé à l'intérieur des nanoparticules. Cependant, si l'interaction entre le polymère et le siRNA est faible, une dégradation partielle par les nucléases est possible, ce qui entraînera par conséquent une diminution de la dose active. Pour déterminer si les polyplexes sont résistants à cette dégradation, différentes techniques existent comme l'électrophorèse sur gel d'agarose après incubation des nanoparticules en présence de nucléases ou de sérum [93, 152].

III.3.3. LE CIBLAGE DE LA TUMEUR

Une fois la protection et le temps de demi-vie optimisés, l'étape suivante dans le développement des polyplexes destinés à être injectés est l'amélioration de leur accumulation sélective au site de la tumeur. Ce ciblage de la tumeur peut être soit passif, soit actif.

a. Le ciblage passif : l'effet EPR

Le ciblage passif de la tumeur par les nanoparticules exploite l'effet EPR. Comme dit précédemment, la plupart des tumeurs solides possèdent une vascularisation fenestrée, avec une augmentation de la perméabilité permettant une amélioration des apports en nutriments et en oxygène, nécessaires à la croissance rapide de la tumeur (Figure 8) [153]. Ces fenestrations présentent des diamètres allant de 200 nm à 1 µm ; ce qui permet le passage et l'accumulation des nanoparticules de la circulation sanguine vers le site de la tumeur [154]. L'accumulation est également favorisée par une faible clairance lymphatique et un retour veineux lent des tissus tumoraux. Ce phénomène peut conduire à une concentration en nanoparticules 10 et 50 fois plus élevée dans la tumeur que dans le reste du corps [25].

Ainsi, Li, Yawata et Honke ont montré une accumulation passive de leurs nanoparticules de chitosan au site de la tumeur, grâce à l'effet EPR. Ces nanoparticules possèdent une taille comprise entre 150 et 200 nm. Ils ont également mis en évidence une accumulation tumorale

accrue lorsque ces particules étaient PEGylées, ce qu'ils expliquent par l'augmentation du temps de demi-vie et donc du nombre de passages des nanoparticules au niveau de la tumeur [155].

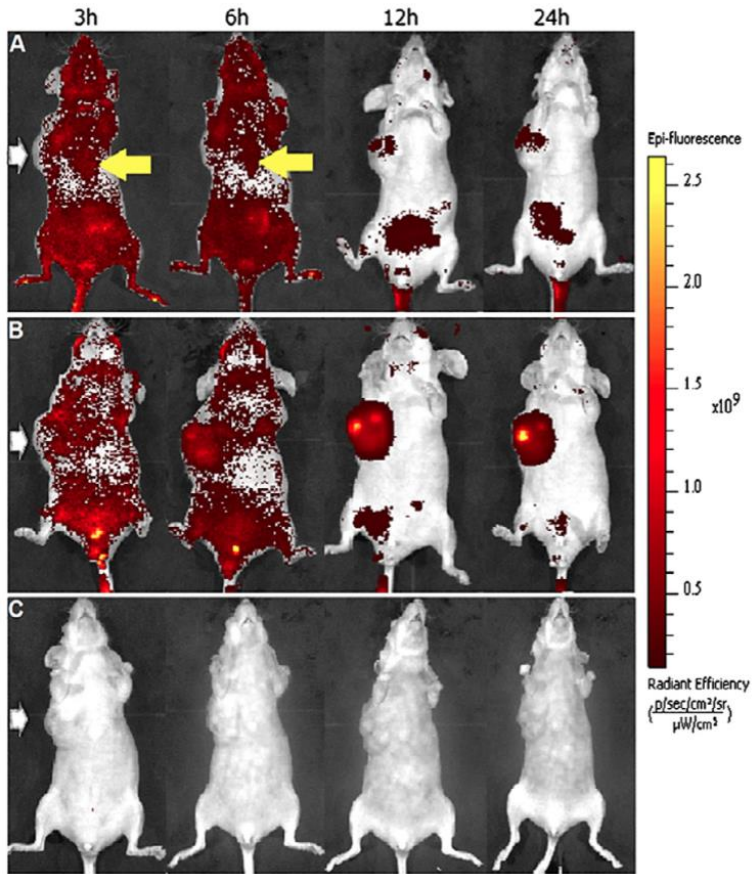


Figure 14. Accumulation tumorale après injection IV de polyplexes de chitosan (A), de polyplexes de chitosan PEGylés (B) et de PBS utilisé comme contrôle (C) (d'après Li *et al.* [155]).

b. Le ciblage actif

Le ciblage actif implique le greffage, à la surface des polyplexes, de ligands dont le récepteur est spécifique des cellules cibles ou surexprimé à leur membrane (Figure 15). La présence de ces ligands spécifiques au niveau des nanoparticules a pour but d'augmenter leur accumulation au niveau de la tumeur, et de permettre une endocytose sélective et efficace [156-158].

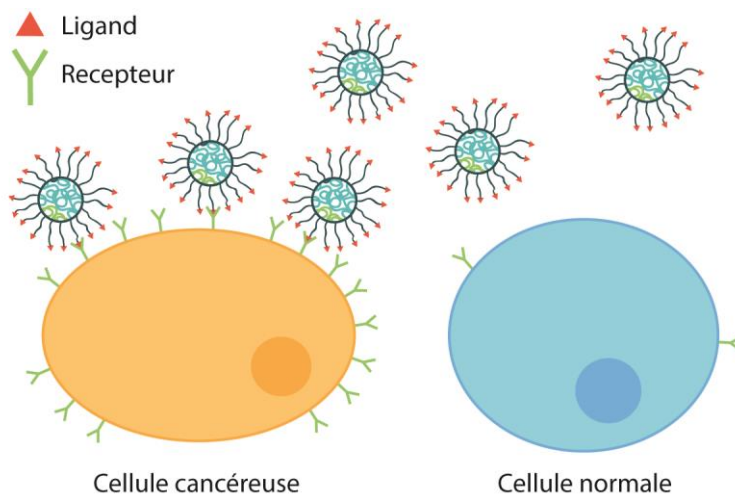


Figure 15. Ciblage actif des cellules cancéreuses.

Les ligands les plus fréquemment utilisés sont des anticorps, en raison de leur spécificité élevée pour l'antigène. Par exemple, deux récepteurs à activité tyrosine kinase, HER2 (pour *Human Epidermal Receptor-2*) et EGFR (pour *Epidermal Growth Factor*), sont des cibles attrayantes, car ils sont surexprimés dans différents types de cancer [159].

Un autre exemple est la lactoferrine. Il s'agit d'une protéine liant le fer capable d'interagir avec le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDL pour *low density lipoprotein*). Ce ligand est par exemple utilisé pour cibler spécifiquement le cerveau, en raison de la surexpression du récepteur aux LDL dans les cellules des gliomes [160].

La transferrine est une autre protéine liant le fer, dont le rôle est de le transporter jusqu'aux cellules en prolifération. Dans les cellules cancéreuses, le récepteur à la transferrine y est surexprimé jusqu'à 100 fois par rapport aux cellules saines, et est donc une cible intéressante [161].

Les aptamères sont des simples brins d'ARN ou d'ADN possédant une haute spécificité et affinité pour leur récepteur, mais avec une taille plus petite que les anticorps [162]. Par exemple, l'aptamère A10 reconnaît spécifiquement le domaine extracellulaire de l'antigène membranaire spécifique de la prostate [163].

Certains peptides sont également souvent utilisés comme ligands d'adressage. Ils ont l'avantage par rapport aux protéines d'être plus petits et donc d'avoir moins d'incidence sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules [164]. Le plus étudié est le peptide RGD (pour Arginine (R)-Glycine (G)-Aspartate (D)), montrant une affinité élevée avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, une protéine transmembranaire dont l'une des extrémités interagit avec les protéines de la matrice extracellulaire. Ce récepteur d'adhésion cellulaire est surexprimé dans de nombreux types de tumeurs solides, ainsi qu'en surface des cellules endothéliales des tissus tumoraux [165, 166].

Une étude récente a montré l'influence de différents analogues du peptide RGD sur l'efficacité antitumorale de polyplexes de chitosan PEGylés. Les analogues variaient en fonction de leur structure chimique (nature du groupement basique), de la nature de leur liaison avec le PEG (hydrophile ou lipophile), et de leur localisation sur cette chaîne de PEG. La meilleure efficacité antitumorale *in vivo* a été obtenue avec le peptide contenant le groupement basique naphthyridine, une liaison avec le PEG de nature lipophile et une localisation aléatoire sur la chaîne de PEG, plutôt que la localisation terminale, utilisée habituellement. Ces résultats ont aussi montré que la localisation du ligand sur la structure de la nanoparticule avait plus d'importance que le nombre de ligands greffés [166].

Pour ce qui est des ligands de type (poly)saccharide, les résidus de galactose sont par exemple capables de se lier aux cellules de carcinome hépatocellulaire, connues pour surexprimer le récepteur d'asialoglycoprotéine (ASGP-R) [167].

Enfin, des petites molécules telles que l'acide folique (vitamine B9) peuvent être utilisées comme ligand d'adressage dans le traitement du cancer. L'acide folique est essentiel pour la synthèse des bases purines et pyrimidines. En raison du taux de réplication élevé des cellules cancéreuses, le récepteur de l'acide folique y est surexprimé. L'affinité élevée de l'acide folique pour son récepteur et la nature non toxique, non immunogène, facilement disponible et économiquement intéressante de cette molécule font de l'acide folique un ligand de choix [156, 168].

III.4. L'ENDOCYTOSE

Une fois le tissu tumoral atteint, les polyplexes doivent entrer à l'intérieur des cellules cibles par endocytose. Les nanoparticules peuvent exploiter différentes voies d'entrée. En fonction du type cellulaire et des caractéristiques des polyplexes comme la taille, la forme et la charge, ou du

ligand d'adressage, les polyplexes utiliseront préférentiellement des voies d'entrée cellulaire différentes. Les deux mécanismes principalement utilisés par les nanoparticules sont les endocytoses clathrine et cavéole-dépendante (Figure 16) [27].

L'endocytose clathrine-dépendante (CME pour *Clathrin-mediated endocytosis*) est un mécanisme très actif dans toutes les cellules animales. Il s'agit de la voie d'endocytose la plus fréquemment utilisée. Par exemple, elle permet l'absorption du cholestérol grâce à l'endocytose des LDL par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, ou l'absorption du fer, transporté par la transferrine, qui sera aussi endocyté par son récepteur [27]. Cette voie peut également être utilisée de façon non spécifique, sans l'intervention d'un récepteur. La clathrine est une protéine en forme de triskèle, composée de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères, assemblées en un maillage polygonal recouvrant la membrane plasmique en formant un puits d'environ 150 nm. Après l'assemblage du puits, la dynamine est recrutée pour la fusion de la membrane et la formation d'une vésicule recouverte de clathrine. Ensuite, les unités de clathrine se dissocient de la vésicule et sont recyclées. Cette vésicule ainsi formée livre ensuite son contenu aux endosomes précoces, qui seront acidifiés par une pompe à protons ATPase, jusqu'à un pH d'environ 6. Ces endosomes précoces mûrissent ensuite en endosomes tardifs (pH ~5) puis en lysosomes après avoir fusionné avec des vésicules prélysosomales contenant des enzymes hydrolytiques actives à pH acide, afin de dégrader le contenu du lysosome [169].

L'endocytose cavéole-dépendante (CavME pour *caveolae-mediated endocytosis*) est un mécanisme abondamment exploité par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes; mais absent dans les neurones et les leucocytes. Les cavéoles, un type de radeau lipidique, sont des domaines membranaires plasmiques enrichis en cholestérol et possédant une morphologie définie (invagination de membrane d'environ 60-80 nm). Ces domaines sont caractérisés par la présence de protéines spécifiques: les cavéolines (situées à la membrane) et les cavines (situées dans le cytoplasme). Le processus d'endocytose cavéole-dépendant n'a pas toujours été bien compris, et a longtemps été un sujet controversé. Aujourd'hui, un consensus semble se dégager. Comme dans la CME, la dynamine contribue à la fusion de la membrane et à la formation de la vésicule de cavéole. La plupart du temps, cette vésicule suit le même parcours que les vésicules recouvertes de clathrine: endosome précoce, endosome tardif puis lysosome et dégradation du contenu [170]. Dans certains cas, cette voie semble contourner la fusion avec les vésicules prélysosomales et la formation du lysosome, via la formation d'un cavéosome. Parce qu'elle peut permettre d'éviter la dégradation lysosomale, cette voie peut être intéressante pour la délivrance de matériel sensible, comme le siRNA [27, 171].

D'autres voies d'entrée ainsi que différentes techniques permettant d'étudier ces voies d'endocytose sont développées au point 8 du chapitre de livre [1].

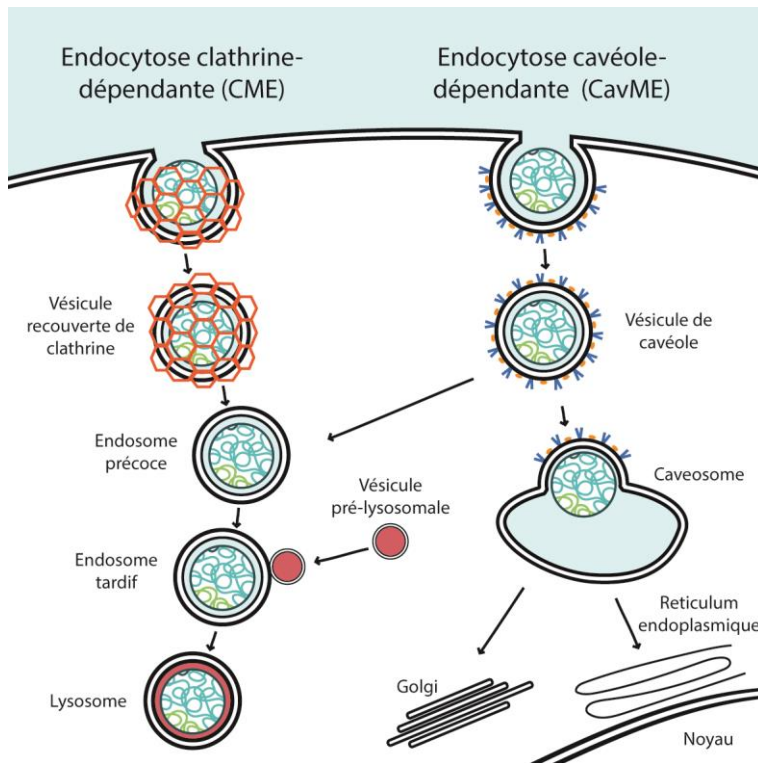


Figure 16. Voies d'endocytose clathrine et cavéole-dépendantes.

Un exemple de l'influence de la taille des nanoparticules sur la voie d'entrée a été montré par Hanes et son équipe. En effet, des particules de polymère de 43 nm rentraient préférentiellement par endocytose clathrine-dépendante, alors que les mêmes particules, mais de taille inférieure (24 nm) rentraient plutôt par endocytose cavéole-dépendante [172]. Cependant, malgré l'entrée préférentielle par une des voies d'endocytose, les polyplexes utilisent souvent plusieurs voies différentes simultanément [27].

III.5. LA LIBÉRATION DE L'ENDOSOME

Après l'endocytose, les nanovecteurs doivent sortir de l'endosome pour atteindre le cytoplasme, lieu d'action du siRNA, et ce, avant la dégradation par les enzymes lysosomales. Cette libération de l'endosome est une étape cruciale dans la délivrance du siRNA. Pour y parvenir, différentes

stratégies peuvent être mises en œuvre, comme la rupture de la membrane endosomale en utilisant le pouvoir tampon des groupes protonables du polymère (mécanisme « d'éponge à protons ») ou par fusion avec la bicouche lipidique [173].

La fusion avec la bicouche lipidique est utilisée principalement par les liposomes. Les membranes de l'endosome et du liposome fusionnent en une seule, ce qui provoque la libération du contenu du liposome dans le cytoplasme. Cette fusion peut être favorisée par la présence de peptides fusogènes greffés sur la surface des nanovecteurs. Lors de l'acidification de l'endosome, les peptides fusogènes interagissent avec les membranes endosomales et induisent leur fusion avec les liposomes [174].

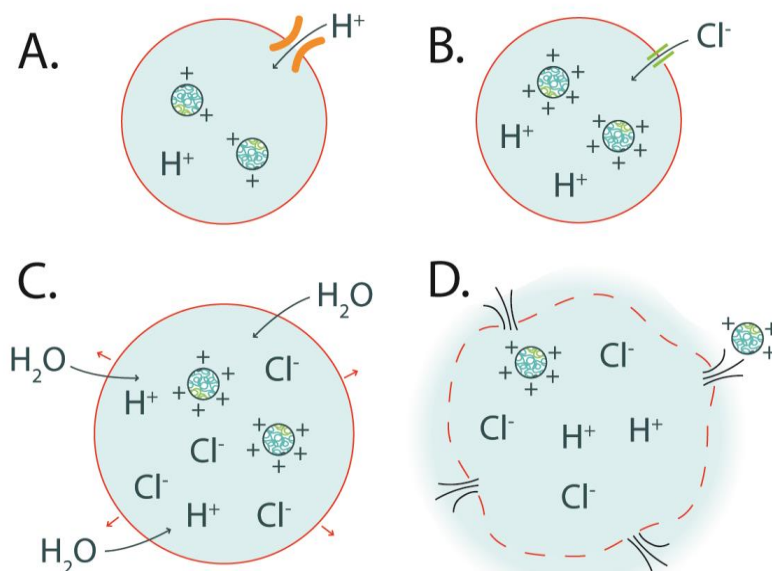


Figure 17. Le mécanisme « d'éponge à protons ». (A) Le polymère capture les protons (H^+) provenant de l'activité d'ATPase de la pompe à protons. (B) Pour maintenir la neutralité, des ions chlore (Cl^-) entrent à leur tour. (C) Diffusion de l'eau à l'intérieur de la vésicule d'endocytose par le phénomène d'osmose. (D) Éclatement de l'endosome et libération de son contenu dans le cytoplasme.

Pour les polyplexes, la stratégie la plus utilisée est le mécanisme « d'éponge à protons » (Figure 17). Les bases faibles (avec un pKa compris entre 5 et 8) présentes sur la structure du polymère, telles que l'histamine et les fonctions morpholines par exemple, peuvent être protonées au cours de l'acidification de l'endosome. Grâce au pouvoir tampon de ces fonctions,

le polymère capture les protons (H^+) provenant de l'activité d'ATPase de la pompe à protons. Pour maintenir la neutralité, des ions chlore (Cl^-) entrent à leur tour, et sont ensuite accompagnés par la diffusion de l'eau à l'intérieur de la vésicule d'endocytose par le phénomène d'osmose. Les polymères avec un pouvoir tampon élevé capturent suffisamment de protons pour attirer une grande quantité d'eau qui, par conséquent, peut provoquer l'éclatement de l'endosome et la libération de son contenu dans le cytoplasme [168, 175-177].

Afin d'explorer les mécanismes de libération de l'endosome, différentes techniques existent [178-181]. Celles-ci sont développées dans le chapitre de livre (point 9) [1].

III.6. LE RELARGAGE DU siRNA DES POLYPLEXES

Une fois que les polyplexes sont libérés de l'endosome, ils se retrouvent dans le cytoplasme. Pour être efficace, le siRNA doit se dissocier du polymère afin de pouvoir s'associer au complexe RISC et dégrader ensuite l'ARNm cible.

Le relargage du siRNA peut être favorisé par des modifications de la structure du polymère engendrées dans certains cas par l'acidification. Un polymère biodégradable peut aussi être dégradé en monomères sous l'action d'enzymes et libérer ainsi le siRNA. Pour améliorer la dégradation du polymère dans l'environnement intracellulaire, des ponts disulfures (-S-S-) peuvent être introduits au niveau de la structure du polymère. Cette stratégie tire parti de la nature plus réductrice de l'environnement intracellulaire par rapport à l'environnement extracellulaire. Les ponts disulfures seront dégradés de manière préférentielle dans le cytoplasme par réaction d'échange thiol-disulfure avec le glutathion, qui y est 50 à 1000 fois plus concentré que dans le milieu extracellulaire [39, 182-184]. Tai et son équipe ont ainsi montré une efficacité accrue de nanoparticules peptidiques contenant des ponts disulfure. La dissociation cytoplasmique entre le siRNA et la nanoparticule a été mise en évidence par microscopie confocale (Figure 18). Celle-ci montre une fluorescence, due au siRNA, plus diffuse avec les nanoparticules contenant des ponts disulfures. Pour les nanoparticules ne contenant pas de ponts disulfures, la fluorescence est moins diffuse et reste concentrée à différents endroits. Ces points de fluorescence concentrés montrent que le siRNA est toujours complexé à la nanoparticule [183].

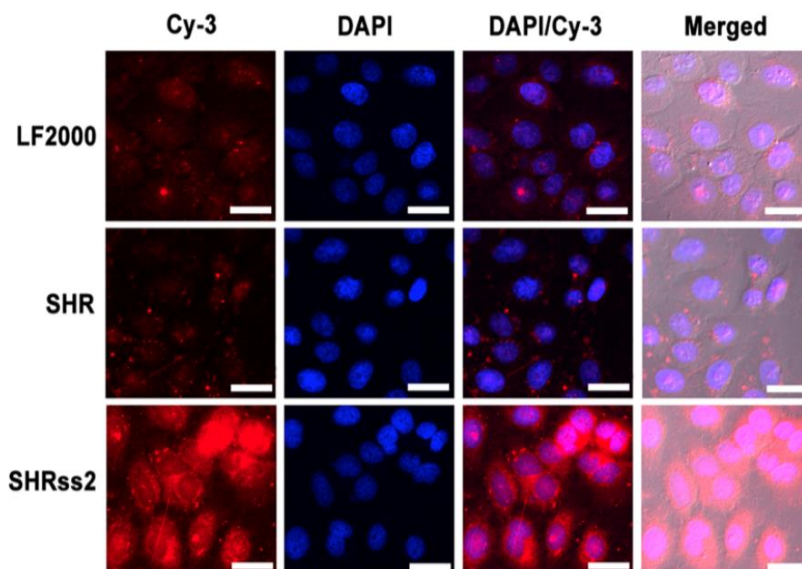


Figure 18. Images de microscopie confocale de cellules HeLa, 3 heures après leur transfection par du siRNA fluo (Cy-3) grâce à de la Lipofectamine 2000® (LF2000), à des nanoparticules peptidiques (SHR) ou à des nanoparticules peptidiques contenant des ponts disulfure (SHRss2). Les nanoparticules SHRss2 présentent une fluorescence diffuse due à la libération du siRNA dans le cytoplasme [183].

IV. LA CIBLE : LES HISTONES DÉACÉTYLASES (HDAC)

Dans le cadre de ce travail, les siRNA utilisés sont dirigés contre certains membres de la famille des histones déacétylases. Ces enzymes sont considérées comme de nouvelles cibles prometteuses en thérapie anticancéreuse.

IV.1. L'ACÉTYLATION DES HISTONES

Chez l'homme, comme chez les autres eucaryotes, l'ADN est localisé dans le noyau des cellules, et se trouve principalement organisé en chromatine. Pour former la chromatine, l'ADN (chargé négativement) est enroulé de 146 paires de bases autour d'un octamère de petites protéines basiques (12-16 kDa, chargées positivement) appelées histones (H2A-H2B-H3-H4), pour former des structures appelées nucléosomes [185]. Ces nucléosomes, « appelés unités de chromatine », se répètent et sont séparés par des segments d'ADN de liaison pour former la chromatine. L'architecture de la chromatine, et donc l'état de compaction de l'ADN, est fortement influencé par les modifications post-traductionnelles des histones, telles que l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation [185].

Parmi celles-ci, l'acétylation des histones est probablement la mieux comprise. Le niveau d'acétylation des histones est régulé par deux familles d'enzymes aux activités antagonistes : les histones acétyltransférases (HAT), qui permettent l'ajout d'un groupement acétyle (COCH_3) au niveau des résidus de lysine situés aux extrémités N-terminales, et les histones déacétylases (HDAC) qui jouent le rôle opposé, en dissociant ce groupement de l'histone. Lorsque les histones sont acétylées, la charge des résidus de lysine devient neutre, diminuant les interactions entre les histones et l'ADN chargé négativement. La chromatine se trouve alors dans un état « ouvert », qui permet l'accessibilité à l'ADN aux processus de réparation, de réplication ou de transcription. Par contre, la déacétylation des histones laisse apparaître la charge positive de la lysine, augmentant les interactions électrostatiques avec l'ADN, et donc l'état de compaction de la chromatine, qui devient « fermée » (Figure 19). Dans cet état, l'ADN n'est plus accessible à la machinerie de transcription, de réplication ou de réparation. Le niveau d'expression génique résulte donc d'un équilibre entre l'activité des HAT et des HDAC. Une augmentation de l'acétylation des histones provoque une plus grande activité transcriptionnelle, tandis qu'une diminution du niveau d'acétylation est associée à une diminution de l'expression des gènes [185-187]. Pour ces raisons, les HDAC, comme les HAT, sont considérés comme des régulateurs transcriptionnels.

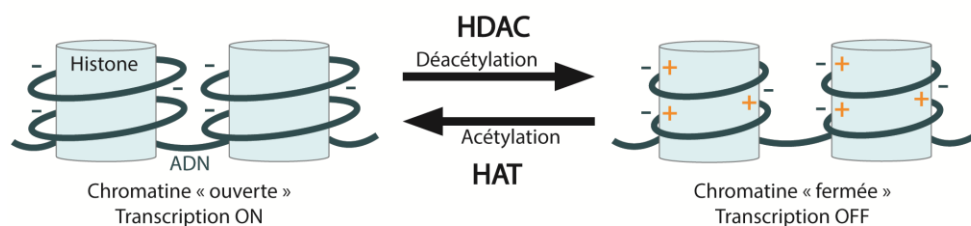


Figure 19. Acétylation et déacétylation des histones.

IV.2. LA CLASSIFICATION DES HDAC

Les HDAC sont une famille d'enzymes dont 18 membres ont été identifiées chez l'homme à ce jour. Elles sont réparties en quatre classes (Figure 20) en fonction de leur masse moléculaire, de leur localisation intracellulaire et de leur homologie avec les histones déacétylases de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [186, 188].

Les HDAC de la classe I comprennent les HDAC1, -2, -3, et -8. Elles ont une taille d'environ 50 kDa, sont exprimées dans tous les tissus, et se situent principalement dans le noyau des cellules.

Les HDAC de la classe II ont une taille supérieure à 100 kDa, et peuvent se situer tant dans le noyau que dans le cytoplasme de la cellule. Leurs rôles sont plus spécifiques en fonction des tissus en comparaison à la classe I. Elles peuvent être subdivisées en deux classes : la classe IIa (HDAC4, -5, -7, et -9) et la classe IIb (HDAC6 et 10). Cette subdivision est due à la présence de deux domaines catalytiques en tandem sur HDAC6 et 10.

La classe IV ne comprend qu'un membre, HDAC11. Cette HDAC est plus proche de la classe I, mais elle ne peut être classée dans aucune classe en raison de trop faibles similarités [189].

Enfin, la classe III est composée de 7 enzymes appelées sirtuines (SIRT1-7). Elles ont un mécanisme d'action qui diffère des HDAC de classe I, II et IV par le fait que leur activité est dépendante du NAD^+ , contrairement aux autres HDAC qui utilisent le Zn^{2+} comme cofacteur. Pour cette raison, l'activité des HDAC de classe III n'est pas affectée par les inhibiteurs pharmacologiques utilisés en clinique [186].

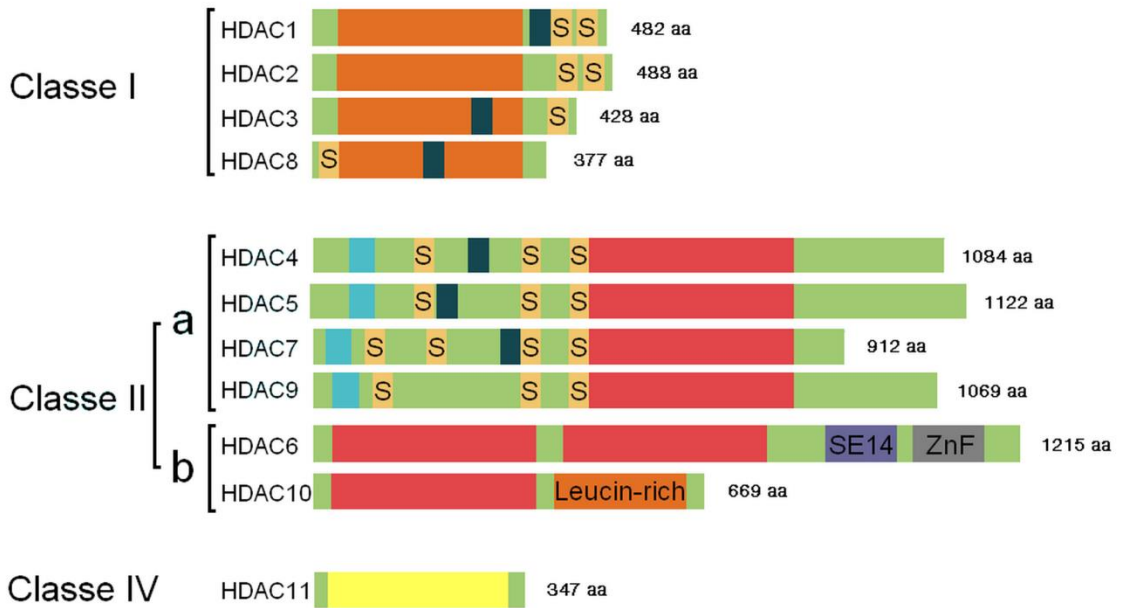


Figure 20. Représentation schématique de la classification des HDAC des classes I, II et IV [186].

IV.3. LES INHIBITEURS D'HDAC EN ONCOLOGIE

Comme mentionné ci-dessus, l'équilibre de l'acétylation des histones, assuré par les histones acétyltransférases et les histones désacétylases, joue un rôle clé dans le contrôle de la transcription génique. Des modifications de l'expression et/ou de l'activité des HDAC ont été identifiées au niveau de cellules tumorales, et la rupture de l'équilibre entre les niveaux d'acétylation et de désacétylation de la chromatine contribuent aux altérations des gènes retrouvées dans de nombreuses tumeurs. Le rajustement de cet équilibre HDAC/HAT constitue donc une stratégie antitumorale intéressante ; ce qui a mené rapidement au développement d'une famille de molécules capables d'inhiber les HDAC. Actuellement, les HDAC de classes I, II et IV sont ciblées par des inhibiteurs pharmacologiques à large spectre, ciblant plusieurs HDAC de façon non sélective [190]. Ces inhibiteurs montrent des effets antitumoraux *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins. En effet, ils sont capables d'altérer l'expression de nombreux gènes, diminuant la prolifération [191, 192], induisant l'apoptose [193, 194], provoquant la différenciation cellulaire de certaines lignées cellulaires [195], ou inhibant l'angiogenèse [196].

INTRODUCTION

D'après la plateforme ClinicalTrials.gov de l'*U.S. National Institutes of Health* (mai 2016), 12 inhibiteurs d'HDAC sont actuellement testés en essais cliniques pour le traitement du cancer, seuls ou en association. Des études de phase II concernent 7 d'entre eux, tandis que 5 font partie d'études cliniques de phase III [7]. Certains inhibiteurs d'HDAC (Tableau 3) ont été récemment approuvés par la FDA et/ou l'EMA pour le traitement du lymphome cutané à cellules T réfractaire ou en rechute après une thérapie systémique antérieure, validant cliniquement le concept de l'utilisation des inhibiteurs d'HDAC dans le traitement du cancer [197-199].

Tableau 3. Inhibiteurs d'HDAC approuvés par la FDA et/ou l'EMA pour le traitement du lymphome cutané à cellules T [197-199].

Molécule	Nom de code	Nom déposé
Acide subéryloylanilide hydroxamique	SAHA	Vorinostat [®]
Romidepsine	Depsipeptide, FK228	Istodax [®]
Belinostat	PXD101	Beleodaq [®]
Panobinostat	LBH589	Farydak [®]

Malgré ces résultats prometteurs dans le traitement de tumeurs hématologiques, le faible index thérapeutique de ces molécules limite leur utilisation dans le traitement des tumeurs solides [200]. Une solution pour augmenter l'efficacité serait le développement d'inhibiteurs plus sélectifs dirigés contre une seule HDAC ou une classe d'HDAC. En ciblant une des HDAC ayant un rôle critique dans le développement de la tumeur, il serait possible d'augmenter l'efficacité antitumorale tout en diminuant les effets toxiques dus à l'inhibition non sélective de plusieurs HDAC [200]. Cependant, le développement d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant spécifiquement une seule HDAC semble particulièrement ardu, et ce notamment parce que ces enzymes partagent entre elles un domaine catalytique hautement conservé [201].

L'utilisation de siRNA pourrait constituer une alternative intéressante pour cibler sélectivement une HDAC jouant un rôle pertinent dans la biologie des cellules cancéreuses. Parmi les HDAC, des études précliniques ont montré que l'inhibition spécifique d'HDAC5 bloque la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et diminue la croissance tumorale *in vivo*, suggérant que l'utilisation de siRNA dirigé contre HDAC5 pourrait apporter des bénéfices dans le traitement du

cancer [202-207]. Aussi, d'autres études ont montré que HDAC7 joue un rôle important dans la création de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), nécessaires au développement, à la croissance et à la dissémination des tumeurs. L'utilisation de siRNA dirigé contre HDAC7 pourrait donc mener à un traitement anti-angiogénique [208, 209].

La vectorisation et la délivrance de siRNA anti-HDAC à usage thérapeutique en oncologie constituent donc un challenge intéressant et novateur que nous souhaitons relever dans le cadre de ce travail.

V. RÉFÉRENCES

1. Frere, A., Evrard, B., Mottet, D., Piel, G., Polymeric Nanoparticles as siRNA Drug Delivery System for Cancer Therapy: The Long Road to Therapeutic Efficiency, in: Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting, Elsevier, 2016, pp. 503-540.
2. Wang, D., Gao, G., *State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications*, Discov Med, 2014. **18**(98): 151-161.
3. Griffin, T.A., Anderson, H.C., Wolfe, J.H., *Ex vivo gene therapy using patient iPSC-derived NSCs reverses pathology in the brain of a homologous mouse model*, Stem Cell Reports, 2015. **4**(5): 835-846.
4. Alton, E.W.F.W., Armstrong, D.K., Ashby, D., Bayfield, K.J., Bilton, D., Bloomfield, E.V., *et al.*, *Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial*, The Lancet Respiratory Medicine, 2015. **3**(9): 684-691.
5. Wu, S., Powers, S., Zhu, W., Hannun, Y.A., *Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development*, Nature, 2016. **529**(7584): 43-47.
6. Zsebo, K., Yaroshinsky, A., Rudy, J.J., Wagner, K., Greenberg, B., Jessup, M., *et al.*, *Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality*, Circ Res, 2014. **114**(1): 101-108.
7. ClinicalTrials.gov, U.S. National Institutes of Health, 2016, <https://clinicaltrials.gov>.
8. 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, 1990. **2**(4): 279-289.
9. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*, Nature, 1998. **391**(6669): 806-811.
10. Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., Saigo, K., *Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors*, Curr Biol, 2003. **13**(1): 41-46.
11. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*, Nature, 2001. **411**(6836): 494-498.
12. Siomi, H., Siomi, M.C., *On the road to reading the RNA-interference code*, Nature, 2009. **457**(7228): 396-404.
13. Young, S.W., Stenzel, M., Jia-Lin, Y., *Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy?*, Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **98**: 159-169.
14. Castanotto, D., Rossi, J.J., *The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics*, Nature, 2009. **457**(7228): 426-433.
15. Naito, Y., Ui-Tei, K., *siRNA Design Software for a Target Gene-Specific RNA Interference*, Front Genet, 2012. **3**: 102-109.
16. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., Khvorova, A., *Rational siRNA design for RNA interference*, Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): 326-330.
17. Gao, K., Huang, L., *Achieving efficient RNAi therapy: Progress and challenges*, Acta Pharmaceutica Sinica B, 2013. **3**(4): 213-225.
18. Gaudin, A., Andrieux, K., Couvreur, P., *Nanomedicines and stroke: Toward translational research*, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2015. **30**: 278-299.
19. Ambardekar, V.V., Han, H.Y., Varney, M.L., Vinogradov, S.V., Singh, R.K., Vetro, J.A., *The modification of siRNA with 3' cholesterol to increase nuclease protection and suppression of native mRNA by select siRNA polyplexes*, Biomaterials, 2011. **32**(5): 1404-1411.
20. Dominska, M., Dykxhoorn, D.M., *Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape*, J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 8): 1183-1189.
21. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J., *Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications*, J Control Release, 2015. **200C**: 138-157.
22. Saengkrit, N., Saesoo, S., Srinuanchai, W., Phunpee, S., Ruktanonchai, U.R., *Influence of curcumin-loaded cationic liposome on anticancer activity for cervical cancer therapy*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **114**: 349-356.

23. Park, J., Park, J., Pei, Y., Xu, J., Yeo, Y., *Pharmacokinetics and biodistribution of recently-developed siRNA nanomedicines*, Adv Drug Deliv Rev, 2015. In Press.
24. Gaudin, A., Yemisci, M., Eroglu, H., Lepetre-Mouelhi, S., Turkoglu, O.F., Donmez-Demir, B., *et al.*, *Squalenoyl adenosine nanoparticles provide neuroprotection after stroke and spinal cord injury*, Nat Nanotechnol, 2014. **9**(12): 1054-1062.
25. Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J., Maeda, H., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting*, Drug Discov Today, 2006. **11**(17-18): 812-818.
26. Du, J.Z., Du, X.J., Mao, C.Q., Wang, J., *Tailor-made dual pH-sensitive polymer-doxorubicin nanoparticles for efficient anticancer drug delivery*, J Am Chem Soc, 2011. **133**(44): 17560-17563.
27. Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., *Endocytosis of nanomedicines*, J Control Release, 2010. **145**(3): 182-195.
28. Markman, J.L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., Ljubimova, J.Y., *Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance*, Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(13-14): 1866-1879.
29. He, Q., Shi, J., *MSN anti-cancer nanomedicines: chemotherapy enhancement, overcoming of drug resistance, and metastasis inhibition*, Adv Mater, 2014. **26**(3): 391-411.
30. Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems*, Biomaterials, 2006. **27**(24): 4356-4373.
31. Weissig, V., Pettinger, T.K., Murdock, N., *Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market*, Int J Nanomedicine, 2014. **9**: 4357-4373.
32. Torchilin, V.P., *Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery*, Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(11): 813-827.
33. Watanabe, N., Yano, K., Tsuyuki, K., Okano, T., Yamato, M., *Re-examination of regulatory opinions in Europe: possible contribution for the approval of the first gene therapy product Glybera*, Mol Ther Methods Clin Dev, 2015. **2**: 14066.
34. Morrison, C., *\$1-million price tag set for Glybera gene therapy*, Nat Biotechnol, 2015. **33**(3): 217-218.
35. Han, X., Ni, W., *Cost-Effectiveness Analysis of Glybera for The Treatment of Lipoprotein Lipase Deficiency*, Value Health, 2015. **18**(7): A756.
36. Pearson, S., Jia, H., Kandachi, K., *China approves first gene therapy*, Nat Biotechnol, 2004. **22**(1): 3-4.
37. Chen, G.X., Zhang, S., He, X.H., Liu, S.Y., Ma, C., Zou, X.P., *Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives*, Onco Targets Ther, 2014. **7**: 1901-1909.
38. Burke, J.M., Lamm, D.L., Meng, M.V., Nemunaitis, J.J., Stephenson, J.J., Arseneau, J.C., *et al.*, *A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer*, J Urol, 2012. **188**(6): 2391-2397.
39. Lee, Y.S., Kim, S.W., *Bioreducible polymers for therapeutic gene delivery*, J Control Release, 2014. **190**: 424-439.
40. Islam, M.A., Park, T.E., Singh, B., Maharjan, S., Firdous, J., Cho, M.H., *et al.*, *Major degradable polyocations as carriers for DNA and siRNA*, J Control Release, 2014. **193**: 74-89.
41. Kapoor, M., Burgess, D.J., Patil, S.D., *Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA*, Int J Pharm, 2012. **427**(1): 35-57.
42. Bunker, A., Magarkar, A., Viitala, T., *Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation*, Biochim Biophys Acta, 2016. In Press.
43. Tros de Ilarduya, C., Sun, Y., Duzgunes, N., *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*, Eur J Pharm Sci, 2010. **40**(3): 159-170.
44. Gomes-da-Silva, L.C., Fonseca, N.A., Moura, V., Pedrosa de Lima, M.C., Simoes, S., Moreira, J.N., *Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges*, Acc Chem Res, 2012. **45**(7): 1163-1171.
45. Dabkowska, A.P., Barlow, D.J., Hughes, A.V., Campbell, R.A., Quinn, P.J., Lawrence, M.J., *The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers*, J R Soc Interface, 2012. **9**(68): 548-561.
46. Majzoub, R.N., Chan, C.L., Ewert, K.K., Silva, B.F., Liang, K.S., Jacovetty, E.L., *et al.*, *Uptake and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome-DNA complexes with and without RGD-tagging*, Biomaterials, 2014. **35**(18): 4996-5005.
47. Masood, F., *Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy*, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **60**: 569-578.
48. Griffiths, G., Nystrom, B., Sable, S.B., Khuller, G.K., *Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis*, Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(11): 827-834.

49. Bishop, C.J., Kozielski, K.L., Green, J.J., *Exploring the role of polymer structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles*, J Control Release, 2015. **219**: 488-499.
50. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., *et al.*, *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): 7297-7301.
51. Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., Anderson, D.G., *Non-viral vectors for gene-based therapy*, Nat Rev Genet, 2014. **15**(8): 541-555.
52. Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G., Szewczyk, A., *A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy*, Mol Ther, 2005. **11**(6): 990-995.
53. Florea, B.I., Meaney, C., Junginger, H.E., Borchard, G., *Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures*, AAPS PharmSci, 2002. **4**(3): E12.
54. Esfand, R., Tomalia, D.A., *Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications*, Drug Discovery Today, 2001. **6**(8): 427-436.
55. Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., *et al.*, *Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo*, Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): 133-148.
56. Reschner, A., Shim, Y.H., Dubois, P., Delvenne, P., Evrard, B., Marcelis, L., *et al.*, *Evaluation of a new biocompatible poly(N-(morpholino ethyl methacrylate)-based copolymer for the delivery of ruthenium oligonucleotides, targeting HPV16 E6 oncogene*, J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(8): 1432-1440.
57. Han, S., Cheng, Q., Wu, Y., Zhou, J., Long, X., Wei, T., *et al.*, *Effects of hydrophobic core components in amphiphilic PDMAEMA nanoparticles on siRNA delivery*, Biomaterials, 2015. **48**: 45-55.
58. Favretto, M.E., Krieg, A., Schubert, S., Schubert, U.S., Brock, R., *Multifunctional poly(methacrylate) polyplex libraries: A platform for gene delivery inspired by nature*, J Control Release, 2015. **209**: 1-11.
59. Cheng, C., Convertine, A.J., Stayton, P.S., Bryers, J.D., *Multifunctional triblock copolymers for intracellular messenger RNA delivery*, Biomaterials, 2012. **33**(28): 6868-6876.
60. Tang, Y., Han, Y., Liu, L., Shen, W., Zhang, H., Wang, Y., *et al.*, *Protective effects and mechanisms of G5 PAMAM dendrimers against acute pancreatitis induced by caerulein in mice*, Biomacromolecules, 2015. **16**(1): 174-182.
61. Cho, H., Gao, J., Kwon, G.S., *PEG-b-PLA micelles and PLGA-b-PEG-b-PLGA sol-gels for drug delivery*, J Control Release, 2015. In Press.
62. Zhang, H., Wang, K., Zhang, P., He, W., Song, A., Luan, Y., *Redox-sensitive micelles assembled from amphiphilic mPEG-PCL-SS-DTX conjugates for the delivery of docetaxel*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2016. **142**: 89-97.
63. Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Preat, V., *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*, J Control Release, 2012. **161**(2): 505-522.
64. Liu, H., Slamovich, E.B., Webster, T.J., *Less harmful acidic degradation of poly(lactico-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition*, Int J Nanomedicine, 2006. **1**(4): 541-545.
65. Ong, Z.Y., Fukushima, K., Coady, D.J., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Rational design of biodegradable cationic polycarbonates for gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 120-126.
66. Xu, J., Feng, E., Song, J., *Renaissance of Aliphatic Polycarbonates: New Techniques and Biomedical Applications*, J Appl Polym Sci, 2014. **131**(5): 39822.
67. Chen, W., Meng, F., Cheng, R., Deng, C., Feijen, J., Zhong, Z., *Advanced Drug and Gene Delivery Systems Based on Functional Biodegradable Polycarbonates and Copolymers*, Journal of Controlled Release, 2014. **190**: 398-414.
68. Geihe, E.I., Cooley, C.B., Simon, J.R., Kiesewetter, M.K., Edward, J.A., Hickerson, R.P., *et al.*, *Designed guanidinium-rich amphipathic oligocarbonate molecular transporters complex, deliver and release siRNA in cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): 13171-13176.
69. Mespouille, L., Coulembier, O., Kawalec, M., Dove, A.P., Dubois, P., *Implementation of metal-free ring-opening polymerization in the preparation of aliphatic polycarbonate materials*, Progress in Polymer Science, 2014. **39**(6): 1144-1164.
70. Seow, W.Y., Yang, Y.Y., *Functional polycarbonates and their self-assemblies as promising non-viral vectors*, Journal of Controlled Release, 2009. **139**(1): 40-47.
71. Dong, X., Tian, H., Chen, L., Chen, J., Chen, X., *Biodegradable mPEG-b-P(MCC-g-OEI) copolymers for efficient gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 135-142.

72. Yang, C., Ong, Z.Y., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Novel biodegradable block copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and cationic polycarbonate: effects of peg configuration on gene delivery*, *Macromol Rapid Commun*, 2011. **32**(22): 1826-1833.
73. Barenholz, Y., *Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*, *J Control Release*, 2012. **160**(2): 117-134.
74. Duncan, R., Gaspar, R., *Nanomedicine(s) under the microscope*, *Mol Pharm*, 2011. **8**(6): 2101-2141.
75. Li, Y., Wang, J., Wientjes, M.G., Au, J.L., *Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor*, *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. **64**(1): 29-39.
76. Sanna, V., Pala, N., Sechi, M., *Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer*, *Int J Nanomedicine*, 2014. **9**: 467-483.
77. Petersen, G.H., Alzghari, S.K., Chee, W., Sankari, S.S., La-Beck, N.M., *Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin*, *J Control Release*, 2016. **232**: 255-264.
78. Miele, E., Spinelli, G.P., Miele, E., Tomao, F., Tomao, S., *Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®) ABI-007 in the treatment of breast cancer*, *International Journal of Nanomedicine*, 2009. **4**: 99-105.
79. Suhr, O.B., Coelho, T., Buades, J., Pouget, J., Conceicao, I., Berk, J., *et al.*, *Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study*, *Orphanet J Rare Dis*, 2015. **10**: 109.
80. Zuckerman, J.E., Davis, M.E., *Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer*, *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(12): 843-856.
81. Zou, H., Wang, Z., Feng, M., *Nanocarriers with tunable surface properties to unblock bottlenecks in systemic drug and gene delivery*, *J Control Release*, 2015. **214**: 121-133.
82. Aied, A., Greiser, U., Pandit, A., Wang, W., *Polymer gene delivery: overcoming the obstacles*, *Drug Discov Today*, 2013. **18**(21-22): 1090-1098.
83. Rasolonjatovo, B., Gomez, J.P., meme, W., Goncalves, C., Huin, C., Bennevault-Celton, V., *et al.*, *Poly(2-methyl-2-oxazoline)-b-poly(tetrahydrofuran)-b-poly(2-methyl-2-oxazoline) amphiphilic triblock copolymers: synthesis, physicochemical characterizations and hydrosolubilizing properties*, *Biomacromolecules*, 2014. **16**(3): 748-756.
84. Nelson, C.E., Kintzing, J.R., Hanna, A., Shannon, J.M., Gupta, M.K., Duvall, C.L., *Balancing Cationic and Hydrophobic Content of PEGylated siRNA Polyplexes Enhances Endosome Escape, Stability, Blood Circulation Time, and Bioactivity in Vivo*, *ACS Nano*, 2013. **7**(10): 8870-8880.
85. Novo, L., Rizzo, L.Y., Golombek, S.K., Dakwar, G.R., Lou, B., Remaut, K., *et al.*, *Decationized polyplexes as stable and safe carrier systems for improved biodistribution in systemic gene therapy*, *J Control Release*, 2014. **195**: 162-175.
86. Lavigne, C., Slater, K., Gajanayaka, N., Duguay, C., Arnau Peyrotte, E., Fortier, G., *et al.*, *Influence of lipoplex surface charge on siRNA delivery: application to the in vitro downregulation of CXCR4 HIV-1 co-receptor*, *Expert Opin Biol Ther*, 2013. **13**(7): 973-985.
87. Kapoor, M., Burgess, D.J., *Cellular uptake mechanisms of novel anionic siRNA lipoplexes*, *Pharm Res*, 2013. **30**(4): 1161-1175.
88. Gary, D.J., Min, J., Kim, Y., Park, K., Won, Y.Y., *The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-Based siRNA Complexes*, *Macromol Biosci*, 2013. **13**(8): 1059-1071.
89. Cavallaro, G., Licciardi, M., Amato, G., Sardo, C., Giammona, G., Farra, R., *et al.*, *Synthesis and characterization of polyaspartamide copolymers obtained by ATRP for nucleic acid delivery*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2014. **466**(1-2): 246-257.
90. Steele, T.W., Zhao, X., Tarcha, P., Kissel, T., *Factors influencing polycation/siRNA colloidal stability toward aerosol lung delivery*, *Eur J Pharm Biopharm*, 2012. **80**(1): 14-24.
91. Troiber, C., Kasper, J.C., Milani, S., Scheible, M., Martin, I., Schaubhut, F., *et al.*, *Comparison of four different particle sizing methods for siRNA polyplex characterization*, *Eur J Pharm Biopharm*, 2012. **84**(2): 255-264.
92. Kasper, J.C., Schaffert, D., Ogris, M., Wagner, E., Friess, W., *Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability--A step closer from promising technology to application*, *J Control Release*, 2011. **151**(3): 246-255.
93. Han, L., Tang, C., Yin, C., *Effect of binding affinity for siRNA on the in vivo antitumor efficacy of polyplexes*, *Biomaterials*, 2013. **34**(21): 5317-5327.
94. Gary, D.J., Puri, N., Won, Y.Y., *Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery*, *J Control Release*, 2007. **121**(1-2): 64-73.

95. Zhou, L., Chen, Z., Wang, F., Yang, X., Zhang, B., *Multifunctional triblock copolymer mP3/4HB-b-PEG-b-PEI for efficient intracellular siRNA delivery and gene silencing*, Acta Biomater, 2013. **9**(4): 6019-6031.
96. Dong, D.W., Xiang, B., Gao, W., Yang, Z.Z., Li, J.Q., Qi, X.R., *pH-responsive complexes using prefunctionalized polymers for synchronous delivery of doxorubicin and siRNA to cancer cells*, Biomaterials, 2013. **34**(20): 4849-4859.
97. Forbes, D.C., Peppas, N.A., *Polymeric Nanocarriers for siRNA Delivery to Murine Macrophages*, Macromol Biosci, 2014. **14**(8): 1096-1105.
98. Zhang, Y., Arrington, L., Boardman, D., Davis, J., Xu, Y., Difelice, K., *et al.*, *The development of an in vitro assay to screen lipid based nanoparticles for siRNA delivery*, J Control Release, 2014. **174**: 7-14.
99. Bertrand, N., Leroux, J.C., *The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective*, J Control Release, 2012. **161**(2): 152-163.
100. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*, Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(1): 1-9.
101. Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*, Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): 941-951.
102. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*, Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): 271-284.
103. Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., *et al.*, *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): 4607-4612.
104. Jiskoot, W., Crommelin, D., *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*, American Assoc. of Pharm. Scientists, 2005.
105. Braeckmans, K., Buyens, K., Bouquet, W., Vervaet, C., Joye, P., De Vos, F., *et al.*, *Sizing nanomatter in biological fluids by fluorescence single particle tracking*, Nano Lett, 2010. **10**(11): 4435-4442.
106. Dakwar, G.R., Zagato, E., Delanghe, J., Hobel, S., Aigner, A., Denys, H., *et al.*, *Colloidal stability of nano-sized particles in the peritoneal fluid: towards optimizing drug delivery systems for intraperitoneal therapy*, Acta Biomater, 2014. **10**(7): 2965-2975.
107. Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D., *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): 12349-12354.
108. Wender, P.A., Galliher, W.C., Goun, E.A., Jones, L.R., Pillow, T.H., *The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms*, Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(4-5): 452-472.
109. Favretto, M.E., Wallbrecher, R., Schmidt, S., van de Putte, R., Brock, R., *Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players?*, J Control Release, 2014. **180**: 81-90.
110. Sokolova, V., Kozlova, D., Knuschke, T., Buer, J., Westendorf, A.M., Epple, M., *Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells*, Acta Biomater, 2013. **9**(7): 7527-7535.
111. Liu, Z., Jiao, Y., Wang, T., Zhang, Y., Xue, W., *Interactions between solubilized polymer molecules and blood components*, J Control Release, 2012. **160**(1): 14-24.
112. Malvern Instruments Ltd., *Zetasizer Nano Series User Manual*, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, 2013.
113. Fonte, P., Reis, S., Sarmiento, B., *Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery*, Journal of Controlled Release, 2016. **225**: 75-86.
114. Kasper, J.C., Kuchler, S., Friess, W., *Lyophilization of synthetic gene carriers*, Methods Mol Biol, 2013. **948**: 133-147.
115. Endres, T., Zheng, M., Beck-Broichsitter, M., Kissel, T., *Lyophilised ready-to-use formulations of PEG-PCL-PEI nano-carriers for siRNA delivery*, Int J Pharm, 2012. **428**(1-2): 121-124.
116. Kasper, J.C., Troiber, C., Kuchler, S., Wagner, E., Friess, W., *Formulation development of lyophilized, long-term stable siRNA/oligoaminoamide polyplexes*, Eur J Pharm Biopharm, 2013. **85**(2): 294-305.
117. Beck-Broichsitter, M., Nicolas, J., Couvreur, P., *Design attributes of long-circulating polymeric drug delivery vehicles*, Eur J Pharm Biopharm, 2015. **97**(Pt B): 304-317.
118. Walkey, C.D., Chan, W.C., *Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment*, Chem Soc Rev, 2012. **41**(7): 2780-2799.
119. Palchetti, S., Colapicchioni, V., Digiacoimo, L., Caracciolo, G., Pozzi, D., Capriotti, A.L., *et al.*, *The protein corona of circulating PEGylated liposomes*, Biochim Biophys Acta, 2015. **1858**(2): 189-196.
120. Wolfram, J., Yang, Y., Shen, J., Moten, A., Chen, C., Shen, H., *et al.*, *The nano-plasma interface: Implications of the protein corona*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **124**: 17-24.

121. Wang, T., Upponi, J.R., Torchilin, V.P., *Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies*, Int J Pharm, 2012. **427**(1): 3-20.
122. Hadjidemetriou, M., Al-Ahmady, Z., Mazza, M., Collins, R.F., Dawson, K., Kostarelos, K., *In Vivo Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles*, ACS Nano, 2015. **9**(8): 8142-8156.
123. Dakwar, G.R., Braeckmans, K., Demeester, J., Ceelen, W., Smedt, S.C.D., Remaut, K., *Disregarded Effect of Biological Fluids in siRNA Delivery: Human Ascites Fluid Severely Restricts Cellular Uptake of Nanoparticles*, ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(43): 24322-24329.
124. Moghimi, S.M., Andersen, A.J., Ahmadvand, D., Wibroe, P.P., Andresen, T.L., Hunter, A.C., *Material properties in complement activation*, Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(12): 1000-1007.
125. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*, Nat Immunol, 2010. **11**(9): 785-797.
126. Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*, Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(6): 428-437.
127. Gagner, J.E., Lopez, M.D., Dordick, J.S., Siegel, R.W., *Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function*, Biomaterials, 2011. **32**(29): 7241-7252.
128. Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Rekić, A., *et al.*, *Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: A comprehensive quantitative proteomic analysis*, ACS Nano, 2011. **5**(9): 7155-7167.
129. Kolate, A., Baradia, D., Patil, S., Vhora, I., Kore, G., Misra, A., *PEG - a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems*, J Control Release, 2014. **192**: 67-81.
130. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*, Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(36): 6288-6308.
131. Rabanel, J.M., Hildgen, P., Banquy, X., *Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation*, J Control Release, 2014. **185**: 71-87.
132. Zhan, X., Tran, K.K., Shen, H., *Effect of the poly(ethylene glycol) (PEG) density on the access and uptake of particles by antigen-presenting cells (APCs) after subcutaneous administration*, Mol Pharm, 2012. **9**(12): 3442-3451.
133. Matsumoto, M., Matsusaki, M., Akashi, M., *Preparation of biodegradable peptide nanospheres with hetero PEG brush surfaces*, Macromol Biosci, 2014. **14**(1): 142-150.
134. Owens, D.E., 3rd, Peppas, N.A., *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*, Int J Pharm, 2006. **307**(1): 93-102.
135. Diaz-Lopez, R., Libong, D., Tsapis, N., Fattal, E., Chaminade, P., *Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluorooctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector*, J Pharm Biomed Anal, 2008. **48**(3): 702-707.
136. VandeVondele, S., Voros, J., Hubbell, J.A., *RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion*, Biotechnol Bioeng, 2003. **82**(7): 784-790.
137. Damodaran, V.B., Fee, C.J., Ruckh, T., Papat, K.C., *Conformational studies of covalently grafted poly(ethylene glycol) on modified solid matrices using X-ray photoelectron spectroscopy*, Langmuir, 2010. **26**(10): 7299-7306.
138. Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L.M., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*, Adv Drug Deliv Rev, 2016. **99**(Pt A): 28-51.
139. Mishra, S., Webster, P., Davis, M.E., *PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles*, Eur J Cell Biol, 2004. **83**(3): 97-111.
140. Hama, S., Itakura, S., Nakai, M., Nakayama, K., Morimoto, S., Suzuki, S., *et al.*, *Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry*, J Control Release, 2015. **206**: 67-74.
141. Cajot, S., Van Butsele, K., Paillard, A., Passirani, C., Garcion, E., Benoit, J.P., *et al.*, *Smart nanocarriers for pH-triggered targeting and release of hydrophobic drugs*, Acta Biomater, 2012. **8**(12): 4215-4223.
142. Hatakeyama, H., Akita, H., Kogure, K., Oishi, M., Nagasaki, Y., Kihira, Y., *et al.*, *Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid*, Gene Ther, 2007. **14**(1): 68-77.
143. Hatakeyama, H., Akita, H., Harashima, H., *A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma*, Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): 152-160.

144. Chen, D., Liu, W., Shen, Y., Mu, H., Zhang, Y., Liang, R., *et al.*, *Effects of a novel pH-sensitive liposome with cleavable esterase-catalyzed and pH-responsive double smart mPEG lipid derivative on ABC phenomenon*, *Int J Nanomedicine*, 2011. **6**: 2053-2061.
145. Yu, H., Nie, Y., Dohmen, C., Li, Y., Wagner, E., *Epidermal growth factor-PEG functionalized PAMAM-pentaethylenhexamine dendron for targeted gene delivery produced by click chemistry*, *Biomacromolecules*, 2011. **12**(6): 2039-2047.
146. Maruyama, K., *Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects*, *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. **63**(3): 161-169.
147. Abu Lila, A.S., Kiwada, H., Ishida, T., *The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage*, *J Control Release*, 2013. **172**(1): 38-47.
148. Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K., Akai, S., Ishii, T., Kenjo, E., *et al.*, *T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes*, *Int J Pharm*, 2010. **392**(1-2): 218-223.
149. Dosio, F., Arpicco, S., Stella, B., Fattal, E., *Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery*, *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **97**: 204-236.
150. Ravar, F., Saadat, E., Gholami, M., Dehghankelishadi, P., Mahdavi, M., Azami, S., *et al.*, *Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation*, *J Control Release*, 2016. **229**: 10-22.
151. Yang, X.Y., Li, Y.X., Li, M., Zhang, L., Feng, L.X., Zhang, N., *Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer*, *Cancer Lett*, 2013. **334**(2): 338-345.
152. Bansal, R., Singh, A.K., Gandhi, R.P., Pant, A.B., Kumar, P., Gupta, K.C., *Galactomannan-PEI based non-viral vectors for targeted delivery of plasmid to macrophages and hepatocytes*, *Eur J Pharm Biopharm*, 2014. **87**(3): 461-471.
153. Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H., *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*, *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. **63**(3): 136-151.
154. Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P., *et al.*, *Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size*, *Cancer Res*, 1995. **55**(17): 3752-3756.
155. Li, T.S., Yawata, T., Honke, K., *Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid-poly(ethylene glycol)-chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: for the potential targeted ovarian cancer gene therapy*, *Eur J Pharm Sci*, 2014. **52**: 48-61.
156. Zhong, Y., Meng, F., Deng, C., Zhong, Z., *Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy*, *Biomacromolecules*, 2014. **15**(6): 1955-1969.
157. Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., Couvreur, P., *Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery*, *Chem Soc Rev*, 2013. **42**(3): 1147-1235.
158. Koo, H., Huh, M.S., Sun, I.-C., Yuk, S.H., Choi, K., Kim, K., *et al.*, *In Vivo Targeted Delivery of Nanoparticles for Theranosis*, *Accounts of Chemical Research*, 2011. **44**(10): 1018-1028.
159. Danhier, F., Feron, O., Preat, V., *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*, *J Control Release*, 2010. **148**(2): 135-146.
160. Pang, Z., Feng, L., Hua, R., Chen, J., Gao, H., Pan, S., *et al.*, *Lactoferrin-Conjugated Biodegradable Polymersome Holding Doxorubicin and Tetrandrine for Chemotherapy of Glioma Rats*, *Molecular Pharmaceutics*, 2010. **7**(6): 1995-2005.
161. Qian, Z.M., Li, H., Sun, H., Ho, K., *Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway*, *Pharmacol Rev*, 2002. **54**(4): 561-587.
162. Xiao, Z., Farokhzad, O.C., *Aptamer-Functionalized Nanoparticles for Medical Applications: Challenges and Opportunities*, *ACS Nano*, 2012. **6**(5): 3670-3676.
163. Gu, F., Zhang, L., Teply, B.A., Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A.F., *et al.*, *Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(7): 2586-2591.
164. Ruoslahti, E., *Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles*, *Adv Mater*, 2012. **24**(28): 3747-3756.
165. Desgrosellier, J.S., Cheresch, D.A., *Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities*, *Nature Reviews Cancer*, 2010. **10**(1): 9-22.
166. Corbet, C., Ragelle, H., Pourcelle, V., Vanvarenberg, K., Marchand-Brynaert, J., Pr at, V., *et al.*, *Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method*, *Journal of Controlled Release*, 2016. **223**: 53-63.

167. Zhong, Y., Yang, W., Sun, H., Cheng, R., Meng, F., Deng, C., *et al.*, *Ligand-directed reduction-sensitive shell-sheddable biodegradable micelles actively deliver doxorubicin into the nuclei of target cancer cells*, *Biomacromolecules*, 2013. **14**(10): 3723-3730.
168. Wang, M., Hu, H., Sun, Y., Qiu, L., Zhang, J., Guan, G., *et al.*, *A pH-sensitive gene delivery system based on folic acid-PEG-chitosan – PAMAM-plasmid DNA complexes for cancer cell targeting*, *Biomaterials*, 2013. **34**(38): 10120-10132.
169. Hillaireau, H., Couvreur, P., *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*, *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(17): 2873-2896.
170. Rewatkar, P.V., Parton, R.G., Parekh, H.S., Parat, M.O., *Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems?*, *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. **91**: 92-108.
171. Carver, L.A., Schnitzer, J.E., *Caveolae: mining little caves for new cancer targets*, *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(8): 571-581.
172. Lai, S.K., Hida, K., Chen, C., Hanes, J., *Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles*, *J Control Release*, 2008. **125**(2): 107-111.
173. Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G., Haisma, H.J., *Endosomal escape pathways for delivery of biologicals*, *J Control Release*, 2011. **151**(3): 220-228.
174. Hatakeyama, H., Ito, E., Akita, H., Oishi, M., Nagasaki, Y., Futaki, S., *et al.*, *A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo*, *J Control Release*, 2009. **139**(2): 127-132.
175. Yousefi, A., Storm, G., Schifflers, R., Mastrobattista, E., *Trends in polymeric delivery of nucleic acids to tumors*, *J Control Release*, 2013. **170**(2): 209-218.
176. Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J.C., Jin, T., Dai, K., *et al.*, *Uptake mechanisms of non-viral gene delivery*, *J Control Release*, 2012. **158**(3): 371-378.
177. van der Aa, L.J., Vader, P., Storm, G., Schifflers, R.M., Engbersen, J.F., *Optimization of poly(amido amine)s as vectors for siRNA delivery*, *J Control Release*, 2011. **150**(2): 177-186.
178. Martens, T.F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S.C., Braeckmans, K., *Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act*, *Nano Today*, 2014. **9**(3): 344-364.
179. Bonner, D.K., Leung, C., Chen-Liang, J., Chingozha, L., Langer, R., Hammond, P.T., *Intracellular trafficking of polyamidoamine-poly(ethylene glycol) block copolymers in DNA delivery*, *Bioconjug Chem*, 2011. **22**(8): 1519-1525.
180. Salomone, F., Cardarelli, F., Di Luca, M., Boccardi, C., Nifosi, R., Bardi, G., *et al.*, *A novel chimeric cell-penetrating peptide with membrane-disruptive properties for efficient endosomal escape*, *J Control Release*, 2012. **163**(3): 293-303.
181. Rehman, Z.u., Hoekstra, D., Zuhorn, I.S., *Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis*, *ACS Nano*, 2013. **7**(5): 3767-3777.
182. Son, S., Namgung, R., Kim, J., Singha, K., Kim, W.J., *Bioreducible Polymers for Gene Silencing and Delivery*, *Accounts of Chemical Research*, 2012. **45**(7): 1100-1112.
183. Tai, Z., Wang, X., Tian, J., Gao, Y., Zhang, L., Yao, C., *et al.*, *Biodegradable Stearylated Peptide with Internal Disulfide Bonds for Efficient Delivery of siRNA In Vitro and In Vivo*, *Biomacromolecules*, 2015. **16**(4): 1119-1130.
184. Yoo, J., Lee, D., Gujrati, V., Rejinold, N.S., Lekshmi, K.M., Uthaman, S., *et al.*, *Bioreducible branched poly(modified nona-arginine) cell-penetrating peptide as a novel gene delivery platform*, *J Control Release*, 2016. In Press.
185. de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*, *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 3): 737-749.
186. Mottet, D., Castronovo, V., *Histone Deacetylases : Anti-Angiogenic Targets in Cancer Therapy*, *Current Cancer Drug Target*, 2012. **10**: 898-913.
187. Verdin, E., Dequiedt, F., Kasler, H.G., *Class II histone deacetylases: versatile regulators*, *Trends in Genetics*, 2003. **19**(5): 286-293.
188. Dokmanovic, M., Clarke, C., Marks, P.A., *Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives*, *Mol Cancer Res*, 2007. **5**(10): 981-989.
189. Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., Atadja, P., *Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family*, *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): 25748-25755.
190. Gloczak, M.A., Seto, E., *Histone deacetylases and cancer*, *Oncogene*, 2007. **26**(37): 5420-5432.
191. Mottet, D., Pirotte, S., Lamour, V., Hagedorn, M., Javerzat, S., Bikfalvi, A., *et al.*, *HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism*, *Oncogene*, 2009. **28**(2): 243-256.

192. Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., Marks, P.A., *Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): 10014-10019.
193. Miller, C.P., Singh, M.M., Rivera-Del Valle, N., Manton, C.A., Chandra, J., *Therapeutic strategies to enhance the anticancer efficacy of histone deacetylase inhibitors*, J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: 514261.
194. Rosato, R.R., Almenara, J.A., Maggio, S.C., Coe, S., Atadja, P., Dent, P., *et al.*, *Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions*, Mol Cancer Ther, 2008. **7**(10): 3285-3297.
195. Yuan, P.X., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Gutkind, J.S., Manji, H.K., Chen, G., *The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth*, J Biol Chem, 2001. **276**(34): 31674-31683.
196. Rossig, L., *Inhibitors of Histone Deacetylation Downregulate the Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Compromise Endothelial Cell Function in Vasorelaxation and Angiogenesis*, Circulation Research, 2002. **91**(9): 837-844.
197. Zhang, J., Zhong, Q., *Histone deacetylase inhibitors and cell death*, Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(20): 3885-3901.
198. Zhang, L., Han, Y., Jiang, Q., Wang, C., Chen, X., Li, X., *et al.*, *Trend of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: isoform selectivity or multitargeted strategy*, Med Res Rev, 2015. **35**(1): 63-84.
199. Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T.L., Wang, G., *Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents*, Molecules, 2015. **20**(3): 3898-3941.
200. Chun, P., *Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors*, Arch Pharm Res, 2015. **38**(6): 933-949.
201. Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., *et al.*, *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*, Nature, 1999. **401**(6749): 188-193.
202. Peixoto, P., Castronovo, V., Matheus, N., Polese, C., Peulen, O., Gonzalez, A., *et al.*, *HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells*, Cell Death & Differentiation, 2012. **19**(7): 1239-1252.
203. Fan, J., Lou, B., Chen, W., Zhang, J., Lin, S., Lv, F.F., *et al.*, *Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest*, Tumour Biol, 2014. **35**(11): 11523-11532.
204. Liu, J., Gu, J., Feng, Z., Yang, Y., Zhu, N., Lu, W., *et al.*, *Both HDAC5 and HDAC6 are required for the proliferation and metastasis of melanoma cells*, J Transl Med, 2016. **14**(1): 7-19.
205. Li, A., Liu, Z., Li, M., Zhou, S., Xu, Y., Xiao, Y., *et al.*, *HDAC5, a potential therapeutic target and prognostic biomarker, promotes proliferation, invasion and migration in human breast cancer*, Oncotarget, 2016. In Press.
206. Feng, G.W., Dong, L.D., Shang, W.J., Pang, X.L., Li, J.F., Liu, L., *et al.*, *HDAC5 promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma by up-regulating Six1 expression*, Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(6): 811-816.
207. Chen, J., Xia, J., Yu, Y.L., Wang, S.Q., Wei, Y.B., Chen, F.Y., *et al.*, *HDAC5 promotes osteosarcoma progression by upregulation of Twist 1 expression*, Tumour Biol, 2014. **35**(2): 1383-1387.
208. Peixoto, P., Blomme, A., Costanza, B., Ronca, R., Rezzola, S., Palacios, A.P., *et al.*, *HDAC7 inhibition resets STAT3 tumorigenic activity in human glioblastoma independently of EGFR and PTEN: new opportunities for selected targeted therapies*, Oncogene, 2016. In Press.
209. Mottet, D., Bellahcene, A., Piroette, S., Waltregny, D., Deroanne, C., Lamour, V., *et al.*, *Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis*, Circulation Research, 2007. **101**(12): 1237-1246.

VI. CHAPITE DE LIVRE

POLYMERIC NANOPARTICLES AS siRNA DRUG DELIVERY SYSTEM FOR CANCER THERAPY: THE LONG ROAD TO THERAPEUTIC EFFICIENCY

Antoine Frère¹, Brigitte Evrard¹, Denis Mottet², Géraldine Piel¹

¹Laboratory of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy – CIRM, University of Liege, Avenue de l'Hopital 1 - 4000 Liege, Belgium

²Protein Signalisation and Interaction – GIGA, University of Liege, Avenue de l'Hopital 1 - 4000 Liege, Belgium

Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting, livre en cours d'édition par Elsevier.

ISBN : 978-0-323-47347-7

Polymeric Nanoparticles as siRNA Drug Delivery System for Cancer Therapy: The Long Road to Therapeutic Efficiency

A. Frère*, B. Evrard*, D. Mottet**, G. Piel*

*LABORATORY OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOPHARMACY—CIRM, UNIVERSITY OF LIEGE, LIEGE, BELGIUM; **PROTEIN SIGNALISATION AND INTERACTION—GIGA, UNIVERSITY OF LIEGE, LIEGE, BELGIUM

1 Introduction

Cancer is one of the major causes of death worldwide, with a greater incidence in more developed countries. In 2012, 14.1 million new cases and 8.2 million deaths were reported by the World Health Organization (WHO) (Torre et al., 2015). The risk of cancer is increased with lifestyle (poor diet, smoking, lack of exercise, etc.) and environment (pollution, exposure to carcinogens, etc.).

Current anticancer treatments, including chemotherapy, surgery, and radiotherapy, are very constraining for the patient and not always efficient. Concerning chemotherapies, dose-limiting toxicity is a considerable drawback due to lack of selectivity of the drug leading to a high concentration in healthy tissues, causing significant undesired effects. In order to improve the pharmacokinetics and the biodistribution of chemotherapeutic agents, these can be encapsulated into nanoparticles in order to increase the selective accumulation at the tumor site and decrease the exposition of healthy tissues. Today, in 2015, several nanotherapeutics indicated in the treatment of different types of cancer are available on the market. The first FDA-approved anticancer nano-system contains doxorubicin encapsulated in PEGylated liposomes (Caelyx/Doxil/LipoDox) (Barenholz, 2012). Myocet also contains doxorubicin but in non-PEGylated liposomes. Other non-PEGylated liposomal formulations are DaunoXome and Depocyt (containing daunorubicin and cytarabine, respectively), Mepact (mifamurtide) or Marqibo and Onco TCS (Vincristine). Besides liposome-based formulations, Abraxane is an albumin-based paclitaxel formulation; Opaxio also contains paclitaxel covalently linked to nanoparticles composed of polyglutamate. NanoTherm is a formulation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with aminosilane. Finally, Oncaspar

is composed of L-asparaginase that is covalently conjugated to monomethoxypolyethylene glycol (mPEG) (Li et al., 2012; Duncan and Gaspar, 2011; Sanna et al., 2014; Torchilin, 2014; Weissig et al., 2014).

A novel strategy to obtain more selective treatments, called RNA interference (RNAi), is actually the focus of many researchers. This cellular mechanism has been discovered in plants and confirmed in the roundworm *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Using this endogenous mechanism, the shutdown of a selective protein is triggered by the action of a homologous double-stranded RNA (dsRNA). Entering the cytoplasm, dsRNA is cleaved by an RNase III enzyme (called Dicer) in fragments of 19–25 base pairs called small-interfering RNA (siRNA). siRNA is capable of being recognized by the RNA-induced silencing complex (RISC), an enzymatic complex capable of separating the siRNA into two single-stranded RNA (ssRNA) chains. One RNA chain is degraded and the other is loaded into the RISC. The RISC associated with the guide ssRNA, looks for complementary cytoplasmic mRNA in the cytoplasm, binds with it, and consequentially, cleaves it. Finally, the cleaved mRNA can no longer be translated in the corresponding protein (Fig. 18.1) (Doi et al., 2003; Elbashir et al., 2001; Siomi and Siomi, 2009).

The cellular mechanism described earlier can be exploited as a strategy in the treatment of cancer (Oh and Park, 2009) and other several chronic diseases (neurodegenerative

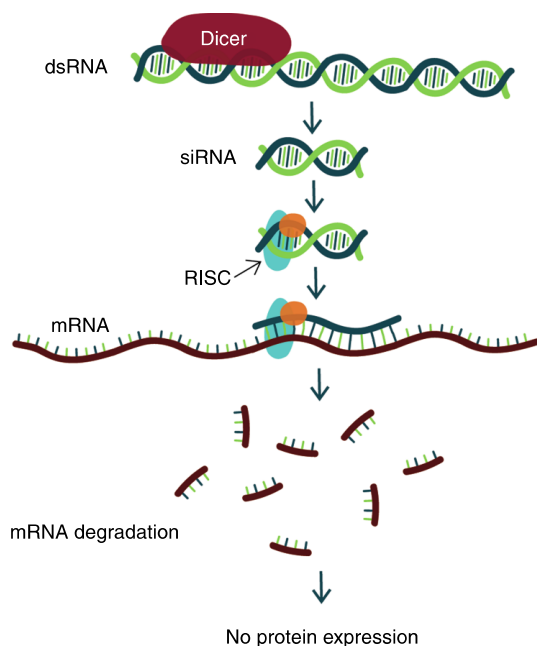


FIGURE 18.1 Mechanism of action of siRNA in mammalian cells.

diseases, inflammatory diseases, etc.). The introduction of a selective siRNA into the cytoplasm of target cells can degrade the complementary mRNA and shut down the expression of the corresponding protein. Using this mechanism, any expression of proteins important or essential for the tumor formation, development, survival, or metastasis formation can be selectively targeted and suppressed, using a siRNA homologous to the sequence of the targeted mRNA (Mottet et al., 2007; Tekedereli et al., 2013).

To achieve the clinical potential of siRNA, safe and efficient delivery materials are required. Indeed, naked siRNA can stimulate the innate immune system and are sensitive to serum nuclease degradation, resulting in a very short half-life in the bloodstream. In addition, the net negative charge and the high molecular weight of the siRNA avoid the diffusion through the positively charged plasma membrane and, therefore, it cannot reach the cytoplasm of target cells (Dominska and Dykxhoorn, 2010).

Therefore, chemical modifications and/or delivery materials are required to bring siRNA to its site of action. A broad diversity of materials can address the challenges of *in vivo* siRNA delivery. These can be categorized in two different types: viral and nonviral vectors. Viral vectors are known for their high transfection efficiency; but their lack of safety, due to the possible induction of an immune response, is the major drawback. However, the first viral vector for gene therapy, Glybera, has been recommended for marketing authorization by the European Medicines Agency (EMA) in 2012, and commercialized in Europe in early 2015. Glybera is an adeno-associated viral vector encoding for the lipoprotein lipase gene, which is indicated in the treatment of the inherited metabolic disorder lipoprotein lipase deficiency (LPLD) (Watanabe et al., 2015; Morrison, 2015). Despite this first approval for viral gene therapy, many researchers have more interest for nonviral vectors because of the nonimmunogenicity, the easy control of their structural and chemical properties, and the ease of manufacturing (Lee and Kim, 2014; Islam et al., 2014). Among these, the most frequent systems for systemic siRNA delivery are polymeric and lipid-based systems, called polyplexes and lipoplexes, respectively. They can be tuned to overcome the barriers to siRNA delivery (Gao and Huang, 2013). Most of the time, the vectors are positively charged to interact with the negatively charged siRNA and form nanoparticles (Zheng et al., 2012; Lim et al., 2013; Lechanteur et al., 2015). But recently, in addition to cationic vectors, amphiphilic, neutral, and anionic vectors have sparked the interest of researchers (Rasolonjatovo et al., 2014; Nelson et al., 2013; Novo et al., 2014; Lavigne et al., 2013; Kapoor and Burgess, 2013).

This chapter will focus on the interest of polymeric vectors for the systemic injection of siRNA in the treatment of cancers. In particular, we will discuss the different strategies that can be adopted to overcome the numerous obstacles that can be reached in the preparation of these types of nanovectors, from the polymer synthesis to the release of the siRNA into the cytoplasm of tumor target cells.

First, polymers and siRNA have to form stable nanoparticles with a high siRNA payload. These polyplexes must possess a suitable charge and size, compatible with intravenous (IV) administration (Bertrand and Leroux, 2012; Gaumet et al., 2008). The stability of the nanoparticles before the injection is essential to guarantee their

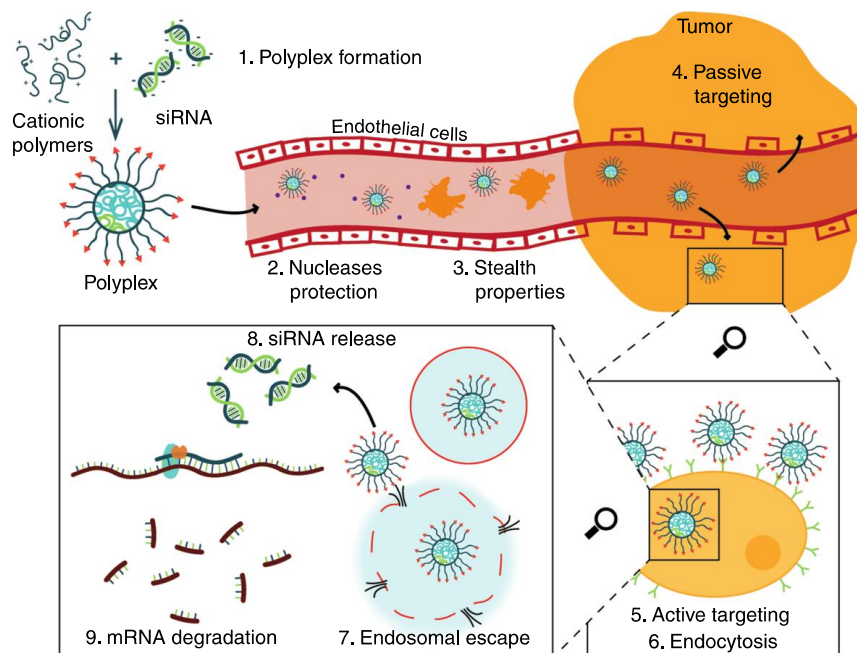


FIGURE 18.2 Several steps required for the polyplex to reach its therapeutic efficiency, from its formation to mRNA degradation.

efficiency over time. After the IV administration, polyplexes are in contact with the bloodstream components. Different strategies exist to avoid the action of the nuclease degradation, the aggregation of plasma proteins, and the recognition by the immune system (Beck-Broichsitter et al., 2015; Owens and Peppas, 2006). The specific accumulation of polyplexes in the tumor site can be obtained by active or passive targeting (Barua and Mitragotri, 2014; Zhong et al., 2014). Once target cells are reached, nanovectors must be endocytosed (Sahay et al., 2010). The phenomenon of endocytosis leads to the formation of an endosome, entrapping the polyplexes. To reach the cytoplasm, the nanoparticles have to escape from the endosome to avoid fusion with the lysosome, resulting in the degradation of the endosomal content (Varkouhi et al., 2011). Once polyplexes have reached the cytoplasm, the last step is the release of the siRNA. When released, free siRNA can interact with the RISC complex. Finally, the system siRNA–RISC is capable of degrading the mRNA complementary to the used siRNA (Fig. 18.2). So, the targeted protein is no longer synthesized and cannot fulfill its function in the development of cancer.

Whereas nuclease protection and immunogenicity are biological barriers that can be addressed by modifying the chemical structure of the siRNA itself, additional delivery materials are necessary to surmount other barriers.

2 Structure and Characteristics of Polymers

Different kinds of polymers are usually used to deliver siRNA. They can be tuned, varying the nature of the backbone, the molecular composition, the architecture (linear, branched, or dendritic polymer), the molecular weight, and so on. All these modifications give infinite possibilities for the polymer synthesis, and confer the physicochemical properties to the polyplexes. Usually, these polymers bind the siRNA electrostatically to form nanoparticles called polyplexes. Cationic functions present on the polymer structures form ionic bonds with the anionic phosphate of the siRNA. The positive charge is usually due to the presence of primary, secondary, tertiary, or quaternary amines. For primary, secondary, and tertiary amines, the charge depends on the pH of the solution, according to the pK_a of the function. On the other hand, quaternary amines are always positively charged, regardless of the pH.

Many polymers have been used to formulate polyplexes.

The most extensively studied polycation for gene delivery is *polyethylenimine* (PEI). PEI can be branched or linear, and possesses a high density of positive charge, provided by the protonable amino nitrogen atoms. This polymer is well known to escape easily from the endosome due to its high buffer capacity (Boussif et al., 1995; Lee et al., 2010). PEI shows a high efficiency for the delivery of siRNA, but also possesses a high cytotoxicity, which varies depending on the architecture and the molecular weight (Moghimi et al., 2005; Florea et al., 2002). In addition, PEI is nonbiodegradable and can accumulate in the body. This toxicity prevents its human use as a carrier for siRNA. To decrease its toxicity, several authors modified the PEI combining it with other polymers, like polycarbonate (Wang et al., 2009), polycaprolactone (Zheng et al., 2012), galactomannan (Bansal et al., 2014), and others.

Poly(amidoamine) dendrimers (PAMAM) are highly branched macromolecules. This family of dendrimers has been the first to be well characterized and commercialized (Esfand and Tomalia, 2001). PAMAM dendrimers are characterized by their generation number, which corresponds to the number of successive ramifications (Malik et al., 2000). The number of terminal cationic amino groups increases exponentially with the generation number: 8 terminal groups for generation 1, 16 for generation 2, 32 for generation 3, and so on. Like PEI, PAMAM dendrimers are not biodegradable. It is also possible to modify these polymers, in order to bring new characteristics and increase the efficiency. To modulate the surface properties, the amino surface group can be modified, to obtain, for example, new PAMAM dendrimers with $-\text{COOH}$ or $-\text{OH}$ terminal chemical functions (Tang et al., 2015). In order to prolong the nanoparticle half-life in vivo, increase their concentration in tumor cells, and enhance the endosomal escape, Wang et al. (2013) have synthesized folic acid-PEG-chitosan-PAMAM dendrimers.

Other frequently used nonbiodegradable polymers are *poly(methacrylate)s* (PMAs), like poly(dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA). Due to the accessibility of the chemistry of these polymers, a variety of monomers can be synthesized. Polymers with different solubilities, siRNA complexabilities, transfection efficiencies, and increased

biocompatibility can be obtained, thereby varying the nature of the core and the side chain (Reschner et al., 2013; Han et al., 2015a; Favretto et al., 2015; Cheng et al., 2012).

Poly-L-lysine (PLL) is a biodegradable homopolymer of the amino acid L-Lysine. The amine group present on the L-lysine possesses a pK_a of 10.2, conferring a positive charge to the polymer at neutral pH, which is useful for the complexation of the siRNA. However, PLL has low transfection efficiency. Polyplexes stay entrapped in the endosome due to the poor buffer capacity (Tros de Ilarduya et al., 2010). To increase the cytoplasmic delivery and thus the efficiency of PLL polyplexes, different modifications have been considered like pH-triggered amphiphilic poly-L-lysine (Guo et al., 2012) and dendrigraft poly-L-lysine (Kodama et al., 2014).

Toward biodegradable polymers, some of the best known with PLL are *poly(lactic acid)* (PLA) (Zhao et al., 2012), *polycaprolactone* (PCL) (Endres et al., 2014), *polycarbonate* (PC), and *poly(lactic-co-glycolic acid)* (PLGA) (Fig. 18.3).

PLGA is a copolymer of the glycolic acid and lactic acid linked together by esters bonds. After administration, the biodegradation leads to the formation of two metabolite monomers, glycolic and lactic acids. These two monomers are used by energy metabolism via the Krebs cycle. This explains the low toxicity of PLGA, which is approved by the FDA and the EMA for drug delivery systems in humans (Danhier et al., 2012). The loading of siRNA into PLGA can be achieved by two approaches: (1) the modification of the PLGA to obtain a cationic polymer, able to form electrostatic interaction with siRNA, or (2) encapsulation of siRNA into the core of PLGA nanoparticles (Singha et al., 2011; Cun et al., 2011).

PCs are a class of polymers that are gaining an increasing attention due to their biodegradability, biocompatibility, and low toxicity characteristics (Ong et al., 2011). In addition, PC degradation does not lead to a decrease in the environmental pH, an effect often observed during polyester degradation, which may cause damage to healthy tissues (Chen et al., 2014). Moreover, this kind of polymer can be produced with respect for the principles of “green chemistry.” For example, the synthesis of polycarbonates is possible by metal-free ring-opening polymerization (Mespouille et al., 2014). In addition, the aliphatic backbone can be easily grafted with different side chains, which contain functional moieties. These functionalities confer novel characteristics to the polymer, like a cationic or amphiphilic nature and/or a tunable buffer capacity (Frère et al., 2015; Geihe et al., 2012).

Natural polymers can also be used to deliver siRNA. The best known is *chitosan*, composed of randomly distributed *N*-acetylglucosamine and glucosamine units. This polymer is obtained by chemical or enzymatic deacetylation of the chitin. Chitin is obtained from the endoskeleton of cephalopods (squids, etc.), the exoskeleton of arthropods (crustaceans), or the cell walls of fungi. The deacetylation reveals a protonable amino function in slightly acidic environments, which brings a cationic charge which permits the complexation with the anionic siRNA. Chitosan is biodegradable and has low toxicity (Ragelle et al., 2013). However, the transfection efficiency of chitosan is limited due to a poor endosomal escape and poor water solubility in solution with pH above 6.5 of chitosan over 20 kDa. These problems can be partially resolved by structural modification like

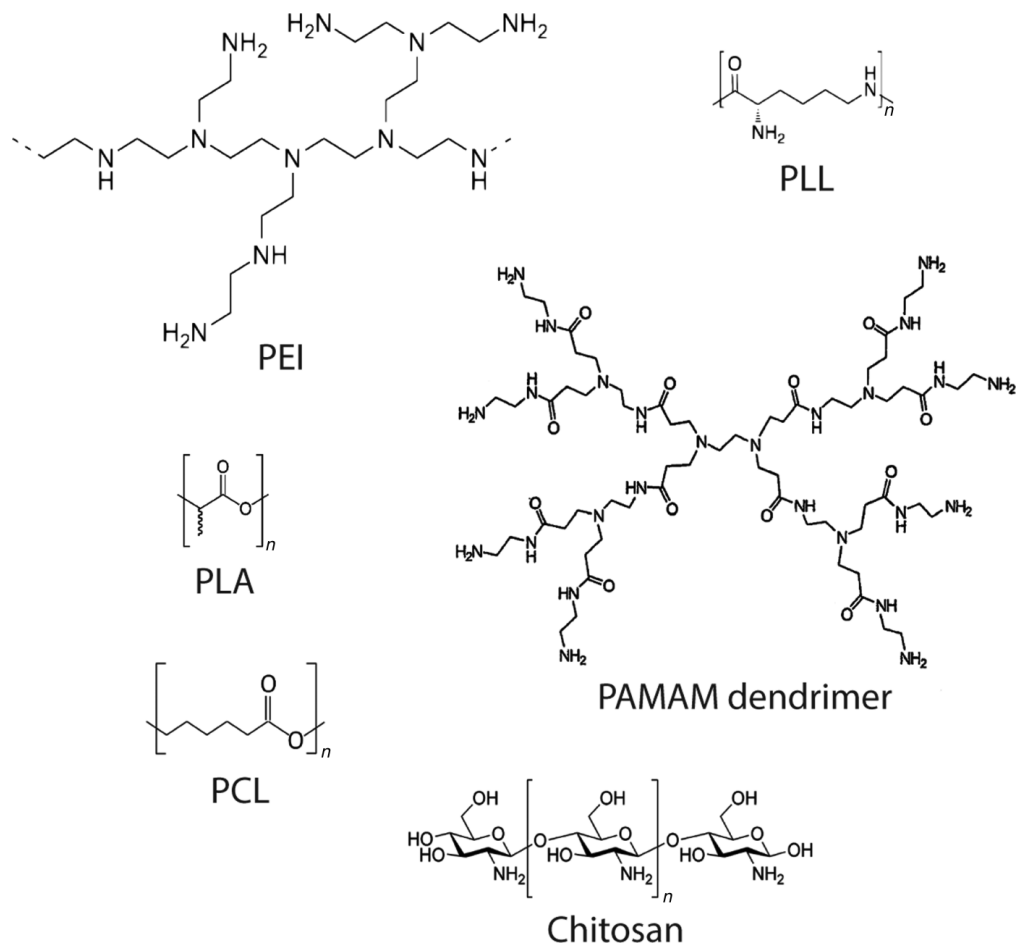


FIGURE 18.3 Structure of different polymers used to form polymeric siRNA delivery systems. PEI, polyethylenimine; PLL, poly-L-lysine; PLA, poly(lactic acid); PAMAM, poly(amidoamine); PCL, polycaprolactone.

quaternization of NH_2 groups to form trimethyl chitosan (TMC), or by linking it with other polymers (Dehousse et al., 2010; Han et al., 2013, 2015b; Ragelle et al., 2015).

3 Formulation of Polyplexes

Polymers and siRNA are self-assembled in solution to form nanoparticles called polyplexes. Due to the cationic charge of the polymer and the anionic charge of the siRNA, ionic bonds are formed to maintain a stable nanoparticle (Fig. 18.4). Of course, both the polymer nature and the length of the siRNA influence the formation and the characteristics



FIGURE 18.4 Formation of polyplexes by electrostatic interaction from cationic polymer and anionic siRNA.

of the polyplex but other parameters have also great influences on its physicochemical properties.

First, the ratio between polymer and siRNA greatly modifies the polyplex characteristics and is one of the most important parameters to take into account. This ratio is often expressed as the “N/P ratio.” The N/P ratio corresponds to the ratio between the number of positively ionisable amine (N for nitrogen) groups of the polymer and the number of negatively charged phosphate (P) groups of the nucleic acid (Gary et al., 2013). The ratio between polymer and siRNA can also be expressed in molar or weight ratio (Cavallaro et al., 2014).

Additionally, the composition of the buffer containing polyplex is also of great importance. The pH, the ionic strength, and the nature of the constituents are parameters influencing the properties of polyplex. According to the pK_a of the functional groups grafted on the polymer, the ionization degree depends on the pH of the buffer. At the pH corresponding to its pK_a , 50% of the ionisable amines are protonated. At $pH = pK_a - 1$, 91% are protonated, and 99% at $pH = pK_a - 2$, but only 9 and 1% at $pK_a + 1$ and $pK_a + 2$, respectively. Functions with a pK_a above 8 are useful for the complexation of the siRNA because of the cationic charge at neutral pH, and functions with pK_a under 7 are useful for the buffer capacity of the polymer to escape from the endosome (see Section 9 for more information). The ionic strength, depending on the salt concentration, have also influence on the polyplex conformation and stability. For example, a low salt concentration (<10 mM) tends to increase the polyplex stability, compared to a high salt concentration, especially at a concentration close to isotonicity (Steele et al., 2012). The size and the zeta potential have shown variations depending on the buffer type and concentration. Troiber et al. (2012) have shown the influence of different buffer on the size of three kinds of polyplexes.

Typically, for optimal characteristics and stability, polyplexes are prepared in buffers with low salt concentrations at pH 7.4, such as 10 or 20 mM HEPES and the tonicity is adjusted with sugars like glucose, trehalose, etc. (Kasper et al., 2011).

Intravenous administration requires several characteristics that polyplex suspensions must possess. According to the European Pharmacopoeia, a parenteral preparation must be sterile, pyrogen-free, close to isotonicity and with a neutral pH value. These features must be considered during the polyplex formulation.

4 Physicochemical Characterization

After the formulation of polyplexes, the physicochemical characterization is a crucial step to understand the properties of nanoparticles and determine if they are suitable for an *in vivo* application. Different characteristics of polyplexes can vary according to the N/P ratio. To determine the optimal physicochemical characteristics, different ratios between the polymer and the siRNA have to be considered and evaluated.

4.1 Incorporation of the siRNA

To effectively form nanoparticles containing siRNA, polymers should first combine with siRNA. The positively charged functional groups present on the polymer structure interact with the anionic siRNA by electrostatic interactions. The nature of these moieties, the charge density, and the molecular weight of the polymer are among the different parameters influencing the complexation of the siRNA. The incorporation rate of the siRNA into the polyplexes can be evaluated using different techniques. The most frequently used is the gel retardation assay (Fig. 18.5). Polyplexes are formulated at different N/P ratios, with a constant siRNA concentration. After the formation, these samples are loaded onto an agarose or polyacrylamide gel and an electric field is applied. The electrophoresis leads to the migration of the free negatively charged siRNA in the gel, toward the positively charged electrode. When incorporated into the polymeric nanoparticle, the siRNA is no longer able to migrate. After the migration, the nonincorporated fraction of siRNA can be detected with a UV transilluminator by the addition of a fluorescent intercalating agent, like ethidium bromide. The intensity of the bands is related to the free fraction of siRNA unincorporated into the polyplexes (Zhou et al., 2013; Dong et al., 2013).

The incorporation of the siRNA can also be more accurately measured by quantifying free siRNA in a suspension of polyplexes. Various types of nucleic acid stains like Ribo-Green RNA Reagent and SYBR Gold (Zheng et al., 2012; Forbes and Peppas, 2014) are able to react with the noncomplexed siRNA and emit a fluorescent signal proportional to the

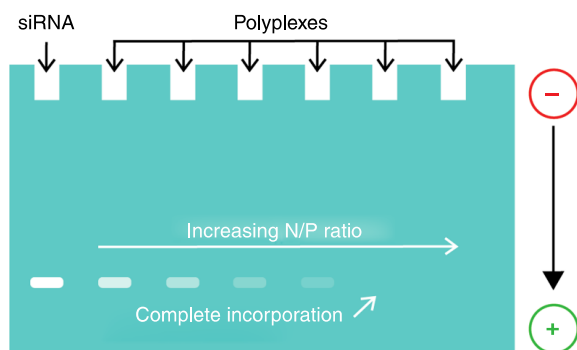


FIGURE 18.5 Principle of the gel retardation assay used to evaluate the incorporation of siRNA into polyplexes.

concentration. Knowing the initial concentration of siRNA and making the difference with the free fraction, the incorporation rate can be calculated. Some of these dyes are also appropriate to replace ethidium bromide in gel retardation assay.

4.2 Nanoparticle Size

To reach the tumor site after administration, which is often far away from the injection site, specific nanoparticle size is required. The diameter of polyplexes is an essential parameter to be taken into account during their development. The optimal size requirement for intravenously injectable nanoparticles used in the treatment of cancer is between 50 and 300 nm (Bertrand and Leroux, 2012; Gaumet et al., 2008). In the bloodstream, smaller nanoparticles are filtered by the glomerulus and excreted in the urine by the kidneys (Gaumet et al., 2008). On the other hand, the liver will trap nanoparticles that are too large, as they cannot pass through the sinusoidal sieve of the spleen, and are phagocytosed by Kupffer cells. Nanoparticles with optimal size accumulate in the tumor tissue due to the enhanced permeability and retention effect (EPR effect). Solid tumors generally possess fenestrated blood vessels. Their endothelium is characterized by large fenestrations, from 200 to 800 nm, allowing the passage and accumulation of nanoparticles at the tumor site (Maeda et al., 2000; Hobbs et al., 1998).

Several techniques can be used to measure the nanometer scale diameter of polyplexes. The easiest and most frequently used method is dynamic light scattering (DLS), also called photon correlation spectroscopy (PCS) (Fig. 18.6). This technique exploits the Brownian movement of nanoparticles in a liquid. The speed of this random

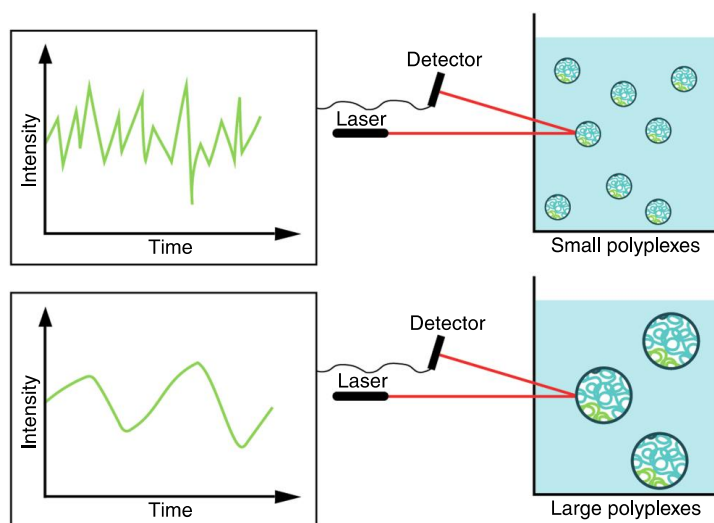


FIGURE 18.6 Principle of size measurement by dynamic light scattering (DLS).

movement is proportional to the size of the particle and to the properties of the medium, like temperature and viscosity. In the same medium, a small particle moves faster than a larger particle. DLS consists of a laser beam that illuminates the sample containing the polyplexes in suspension. Every particle illuminated by the laser scatters the light beam. A detector records the average intensity of the scattered light and measures the rate of this intensity fluctuation. A smaller particle will have a higher fluctuation compared to a larger one because of the speed of the particles in the liquid. DLS is a rapid method to determine the size distribution and the polydispersity index (PDI) of the sample. However, as the intensity of the scattered light is proportional to the sixth power of the diameter, a small amount of nanoparticle aggregation or a polydispersed population of nanocolloids can greatly modify the results obtained (Jiskoot and Crommelin, 2005). Thus, caution should be taken during the evaluation of the results (Gaumet et al., 2008).

Another method is nanoparticle tracking analysis (NTA). This technique combines the laser light scattering microscopy and a charge-coupled device camera. NTA allows the visualization of the nanoparticles in solution, thanks to the camera recording the scattered light from the nanocolloids. NTA also uses the Brownian motion of nanoparticles to calculate the size with an algorithm derived from the Stoke–Einstein equation. The great advantage of NTA, as compared to DLS, is the ability to resolve and distinguish between two different size populations in a polydisperse sample with a good peak resolution, which is contrary to the size requirements of DLS, for which a size factor of 3 is necessary. The major drawbacks of NTA are: (1) the concentration range (NTA requires more concentrated samples); (2) the optimization of NTA measurements (these are more complicated and require several optimization steps that can be time-consuming); and finally, (3) the reproducibility (NTA is less statistically robust than DLS due to the larger amount of data collected during DLS measurement) (Filipe et al., 2010).

The more accurate method, even if more expensive and difficult to implement, is electron microscopy, including scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Sample preparation for the SEM includes drying the sample on a support, followed by coating the sample with a thin layer of platinum or gold. SEM resolution is often between 3 and 5 nm but can reach up to 1 nm in more recent and powerful microscopes. TEM requires several preparation steps, as well, which vary with the sample properties. Resolution of TEM is much higher than SEM, and can give more information about the internal morphology of the nanoparticles. But TEM images are in two dimensions, compared to the three-dimensional images obtained with SEM. The advantages of these microscopy techniques are the potential to observe the sample and to obtain accurate data about the size, dispersion, and morphology of the nanoparticles (Gaumet et al., 2008).

There are other methods to determine the diameter of nano-sized polyplexes, like atomic force microscopy (AFM), field flow fractionation (FFF), and capillary electrophoresis (CE). But the use of these methods is sporadic: they are not adapted for all types of samples and they are difficult to perform.

4.3 Zeta Potential

The surface charge of nanoparticles is represented by the zeta potential (or ζ potential). Polar liquids, like water, contain a lot of ions. Charged particles, dispersed in such liquids, attract the oppositely charged ions to form a strongly bound layer, called the Stern layer. The Stern layer contains ions absorbed directly onto the particle's surface. On the surface of the Stern layer, a second layer, called the diffuse layer, is formed by ions having an opposite charge. These ions are loosely bound to the particle. Zeta potential is the electric potential difference between the dispersion liquid and the Stern layer (Fig. 18.7). Zeta potential gives valuable information about the superficial charge of the particle in solution (Malvern Instruments Ltd, 2013).

To measure zeta potential, the most used technique is laser Doppler velocimetry (LDV). This technique is similar to DLS, which is used for size measurement, but with an electric field applied to the sample. The scattered light produces a signal, the intensity of which

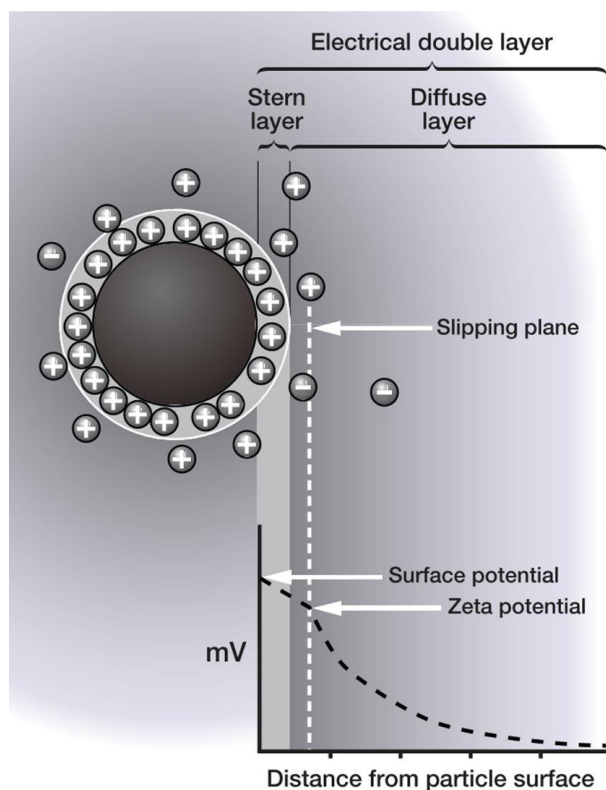


FIGURE 18.7 Schematic representation of zeta potential. Reproduced with permission from Malvern Instruments Ltd (2013).

fluctuates with the speed of the particles. This velocity that can be measured is dependent on four factors: voltage gradient, dielectric constant of the medium, viscosity of the medium, and the zeta potential. If the three first parameters are known, zeta potential can be calculated.

Zeta potential of polyplexes is an important parameter that influences many pharmacological aspects of the nanoparticle: interaction with plasma membrane for the endocytosis mechanism, interaction with blood constituents, and colloidal stability in suspension.

First, to be able to interact with negatively charged constituents of the cell membranes (such as proteoglycans, phospholipids, and fatty acids) in order to be endocytosed, polyplexes must possess a positive zeta potential (Mislick and Baldeschwieler, 1996; Wender et al., 2008). But recently, several authors showed a high cellular uptake of negatively charged nanoparticles (Kapoor and Burgess, 2013; Sokolova et al., 2013). This theory of positively charged nanoparticles is thus brought into question, and the mechanism of endocytosis of nanoparticles is not yet perfectly known.

Second, the surface charge can influence the interaction with blood constituents and modulate the toxicity of nanoparticles. Positively charged nanoparticles are well known to aggregate with negatively charged plasma proteins, like albumin or proteins of the complement system. Cationic polyplexes can also interact with red blood cells, which are also negatively charged. Polyplexes with high positive zeta potential could cause hemolysis, hemagglutination, or aggregation of red blood cells (Liu et al., 2012). To avoid these unwanted interactions, the positive charge of polyplexes must be reduced with the use of polyethylene glycol (PEG). This hydrophilic and neutral polymer can form a corona around the particle to repulse blood constituents and form stealth polyplexes. This point will be discussed in detail in Section 6.

Finally, in a colloidal dispersion, such as a suspension of polyplexes, the zeta potential influences the degree of repulsion between the similarly charged particles. If the particles have a high zeta potential, the repulsion will be stronger. Lowly charged nanoparticles tend to have a lower stability and to flocculate. Generally, a nanometric dispersion is considered to be stable if its zeta potential is higher than +30 mV or lower than -30 mV (Malvern Instruments Ltd, 2013).

5 Stability of Polyplexes

As explained in the last paragraph, a suspension of nanoparticles, like polyplexes, with a zeta potential between -30 mV and +30 mV, is considered unstable. The stability of such dispersions reduces as the zeta potential moves close to neutral value, and can vary from a few hours to a few days. These polyplexes should be prepared freshly before use to ensure optimal efficiency.

Obviously, such a low stability is not adapted to a pharmaceutical product that has to be stable for at least a few months. However, different strategies are available to increase the colloidal stability.

The first method to increase stability of polyplexes with low zeta potential is the introduction of PEG. As explained previously, PEG can form a corona that confers steric repulsion between polyplexes, increasing the colloidal stability. Different types of PEG with different molecular weights can influence the stability. It has been shown that the colloidal stability can be drastically increased with a low percentage of PEG (Steele et al., 2012).

The second method is lyophilization (or freeze-drying), which is an attractive technique for long-term stability of polyplexes (Kasper et al., 2013a). Lyophilization consists of freezing the sample, followed by reduction of the surrounding pressure, in order to sublimate the frozen water directly from the solid state to the gas phase. This dehydration process helps to preserve the integrity of the sample. However, freeze-drying involves stress factors for polyplexes: freezing and water removal can cause damages and denature the nanoparticles. To avoid these damages, a lyoprotectant should be used as an additive. These additives are typically sugars, like glucose, sucrose, trehalose, mannitol, and the like. Lyoprotectants protect the polyplexes suspension during lyophilization, forming a glassy matrix around the nanoparticles (Endres et al., 2012). Also, different cycles of lyophilization can be used with different freezing temperatures and/or desiccation time. After the lyophilization step, the formulation of polyplexes can be stored long-term. The stability of polyplexes can be optimized by selecting the optimal lyophilization cycle, lyoprotectant (nature and concentration), and conditions of storage, like temperature and humidity (Kasper et al., 2013b). Lyophilized samples can be used any time, after rehydration of polyplexes with the appropriate buffer applied shortly before administration.

6 Blood Stability After Systemic Injection

6.1 Degradation by the Immune System

Once polyplexes with optimal physicochemical characteristics are produced, the parenteral injection can be considered. To attend the pharmacological effect and exploit the benefits of nanoparticle-based delivery systems, like tumor tissue accumulation by active or passive targeting, polyplexes must have a prolonged half-life in the blood compartment. A long residence time in the bloodstream would increase the number of passages through the tumor tissue and thus increase the chances of accumulation (Beck-Broichsitter et al., 2015). After parenteral injection, polyplexes are in contact with numerous blood constituents, some of which are implicated in the clearance of exogenous substances, leading to the degradation of polyplexes and reduction of the biological half-life. Blood clearance is initiated by the adsorption of negatively charged plasma proteins on the surface of positively charged polymeric nanoparticles. This phenomenon of plasma protein adsorption is called opsonization (Aggarwal et al., 2009). Polyplexes are covered by a dense layer of adsorbed proteins, which are mainly composed of serum albumin (Walkey and Chan, 2012). Beside serum albumin, other kinds of proteins are involved in the aggregation. Immunoglobulins, like IgM and IgG, can adsorb, resulting from an immunogenic

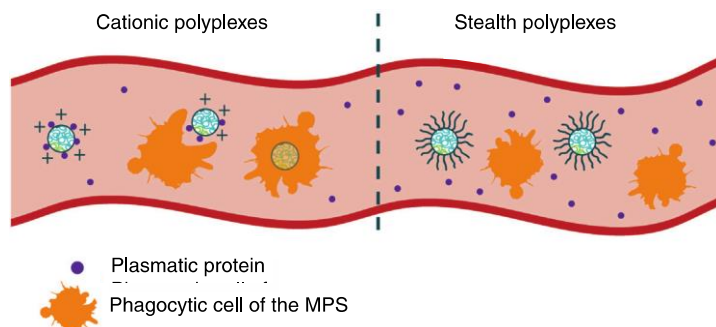


FIGURE 18.8 Blood stability of cationic polyplexes versus stealth polyplexes.

reaction caused by the injection of polyplexes. Complement factors (C3, C4, and C5) are also able to bind the polyplexes (Vonarbourg et al., 2006). Moreover, the presence of these polyplexes can also lead to uncontrolled activation of the complement system. This system contains around 30 proteins (plasmatic or membrane-bound) involved in the recognition and removal of exogenous substances. Depending on the nature of the polyplex, the complement system is activated by different pathways: the classical, the alternative, and/or the lectin pathways (Moghimi et al., 2011). Finally, the activation of the complement system leads to the cleavage of factor C3 into two fragments: C3a and C3b. C3a causes inflammation upon its release while C3b helps in the cleavage of other proteins and mainly in the recognition by macrophages. Once polyplexes adsorb on their surface immunoglobulins and/or complement factors, they become recognizable as exogenous material to the macrophages. These nanoparticles are then recognized and phagocytosed by macrophages of the mononuclear phagocytic system (MPS) leading to their irreversible elimination and degradation from the bloodstream (Ricklin et al., 2010). Physicochemical characteristics of polyplexes significantly influence their clearance, like size, shape, charge, surface chemical composition, and deformability of the nanoparticle.

To avoid this recognition by the immune system and prolong the circulation half-life, different strategies can be considered (Fig. 18.8). The most frequently employed and most studied method to increase the half-life is the use of the hydrophilic polymer polyethylene glycol (PEG). PEG is a safe and nontoxic polymer composed by ethylene oxide monomers, and approved by the FDA for human use (Kolate et al., 2014). When attached to the surface of the polyplex, PEG chains bind water molecules at the surface of the nanoparticle, creating an aqueous layer. This hydrated layer on the surface of the particle reduces interaction with plasma proteins, more or less depending on the coverage density, the conformation, and the molecular weight of PEG chains. These nanoparticles are called “stealth” because they become invisible for the immune system (Beck-Broichsitter et al., 2015). In addition, the PEG layers decrease the tendency of polyplexes to aggregate due to increased steric repulsion between nanoparticles. Storage stability before use is thus increased (Knop et al., 2010).

There are different ways to graft PEG around the polymeric nanoparticles, either before or after the polyplex formation. First, the native polymer used to form polyplexes can be tuned with PEG. A hydrophilic chain of PEG can be covalently bound to an extremity of the polymer during the reaction process (Gary et al., 2013; Yang et al., 2011). This method resulted in a high density of the PEG layer and, consequently, long-term stability of the nanoparticle suspension (Rabanel et al., 2014). It is also possible to add amphiphilic emulsifiers, like PEG-stearate or DSPE-PEG, during the polyplex preparation. This strategy can be exploited if the polymer has affinity for the hydrophobic portion of the amphiphilic emulsifier utilized to stabilize the nanoparticle (Diaz-Lopez et al., 2008). The major drawback of this technique is the presence of free emulsifier residual in solution after the formulation. Methods involving covalent PEGylation of the preformed polymeric nanoparticle include the grafting of a PEG chain directly on a reactive group present on the polyplex surface, for example, grafting it on an amino group (Zhan et al., 2012) or by thiol coupling (Matsumoto et al., 2014). Several disadvantages exist for the PEG grafting method, as previously described: the necessity to know the number of reactive groups placed at the nanoparticle surface, the purifications steps after the PEGylation, which is not required in other methods, and the density of PEG limited by steric hindrance caused by newly grafted PEG chains (Rabanel et al., 2014). A noncovalent binding of the PEG to the surface of the polyplex, called physisorption, is possible, thereby exploiting hydrophobic or electrostatic interactions, depending on the physicochemical properties of the nanoparticle surface. For hydrophobic surfaces, poloxamers [triblock copolymers of PEG and poly(propylene glycol) (PPG)] can be used. The hydrophobic PPG block anchors both hydrophilic PEG blocks on the surface of the polyplex by noncovalent binding (Owens and Peppas, 2006). Block copolymers like PLL-PEG, are able to anchor to polyplexes with a hydrophilic surface (VandeVondele et al., 2003). This method is simple and convenient, but the low stability of anchorage, the limited density of PEG, and the additional purification steps needed are the principal drawbacks.

The interaction of PEGylated polyplexes with plasma protein depends on the length and the grafting density of the PEG chains, resulting in different PEG conformations on the particle surface. At low density, PEG chains adopt a *mushroom* conformation. This conformation is achieved when the distance between two PEG molecules, placed on the surface of the polyplex, is larger than the length of the individual PEG chain. In the *mushroom* conformation, PEG chains are bent on the nanoparticle surface and possess an elevated degree of mobility. This conformation is not sufficient to hide the polyplex surface; thus, partial protein adsorption is still possible. Modifications of the conformation of the PEG chains are observed with the increase of their density on the nanoparticle surface. In this case, PEG chains are closer, which reduces their mobility. Consequently, the PEG molecules arrange in a *brush* conformation, characterized by chains fully extended from the surface (Fig. 18.9). This conformation allows a dense coating, decreasing drastically the possible interaction with the constituents of the biological environment (Damodaran et al., 2010).

The molecular weight of the PEG chain and determining its length are also crucial parameters in the formulation of stealth polyplex. According to the literature, PEGylated

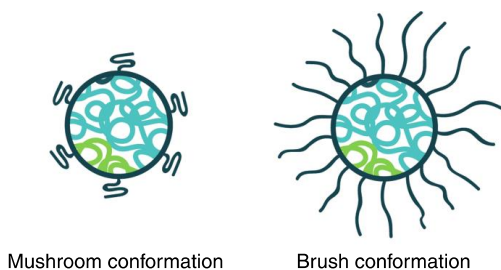


FIGURE 18.9 Mushroom and brush conformation of the PEG corona.

nanoparticles can acquire stealth properties with chains of a molecular weight >2 kDa. The loss of efficiency of shorter PEG chains (and with lower molecular weight) would be due to the decrease in their flexibility (Owens and Peppas, 2006).

Although PEGylation increases the half-life of polyplexes in the bloodstream and thus the concentration at the tumor site, it decreases the cellular uptake and endosomal escape of nanoparticles. This problem is known as the “PEG dilemma” (Mishra et al., 2004; Hama et al., 2015). The positive surface charge of polyplexes decreases with the addition of PEG molecules, with a consequent reduction of the interaction of nanoparticle with the plasma proteins, but also with the cellular membranes of the cells which compose the target tissue. Different strategies can be considered to increase the cellular uptake of PEGylated polyplexes. The first strategy is the use of cleavable linkages between the PEG and the nanoparticle in response to specific stimuli of the tumor environment. Tumor tissue, for example, can express high levels of matrix metalloproteinase (MMP). If PEG is bound to the polyplex through a peptide cleavable by MMP, PEG will dissociate from the nanoparticle when penetrating into the tumor. Polyplexes will be free of PEG and the cellular uptake will be increased (Hatakeyama et al., 2007). Tumor environment can have also a lower pH than the physiological pH. This condition can also be used to release PEG from polyplexes, for example, by using a pH-sensitive hydrazone bond (Chen et al., 2011). The second strategy is the grafting of targeting ligands at the end of the PEG chains, like transferrin and growth factors. Overexpressed receptors at the surface of tumor cells will increase the specific endocytosis of these polymeric nanoparticles (Yu et al., 2011). This will be more discussed in Section 7.

Another drawback of the PEGylation is the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. ABC is observed in case of multiple parenteral administrations of PEGylated nanoparticle dispersion. In fact, an unexpected pharmacokinetics modification is observed from the systemic injection of the second dose of PEGylated nanodispersions. Polyplexes administrated after the first injection are rapidly cleared from the bloodstream because of an accumulation in the liver. This phenomenon is due to the production of specific anti-PEG IgM in the spleen by splenic marginal zone (MZ) B cells, after the first injection of PEGylated nanoparticles. During the second injection, anti-PEG IgM will recognize and bind the polyplex PEG layer with a consequent activation of the IgM-mediated

complement, leading to the complement-receptor mediated endocytosis by liver macrophages of the mononuclear phagocytic system (Abu Lila et al., 2013; Koide et al., 2010).

There are some potential alternatives to PEGylation to obtain stealth polyplexes, like natural or synthetic polymers. Among the natural polymers used in a wide range, we can list heparin (Lee et al., 2008), chitosan (Janes et al., 2001), or dextran (Sugahara et al., 2007), which are capable of increasing the stealth properties of nanoparticles and reducing the ABC effect. Synthetic polymers can also be used, like poly(amino acid)s (Brocchini et al., 2008), poly(acrylamide) (Li and Wallace, 2008), and poly(glycerol) (Pasut et al., 2008).

6.2 Degradation by the Nucleases

One of the reasons for why it is impossible to administer unprotected siRNA is the presence of nucleases in the bloodstream. Normally, when incorporated into stable polyplexes, nucleases have no access to siRNA, which is therefore protected in the nanoparticles. However, a weak interaction between siRNA and polymers can increase the susceptibility to nuclease degradation, resulting in a low dose of siRNA in the target site. To determine if polyplexes are resistant to nuclease degradation, the gel retardation assay can be used. Polyplexes are incubated with commercially available nuclease for a certain period of time. Then, nuclease activity is inhibited and nondegraded siRNA is released from the polyplexes using a competitive agent like heparin. The sample can finally be loaded on the migration gel, as in the gel retardation assay (Section 4.1). If the siRNA has been protected inside the nanoparticle, the intensity of the spot should be equal to untreated controls (Han et al., 2013; Bansal et al., 2014).

7 Targeting

After the formulation of injectable polyplexes, the next step is to increase their selective accumulation at the tumor site. The targeting of the tumor may be performed by two different ways: passive targeting or active targeting.

7.1 Passive Targeting

The passive targeting of nanoparticles exploits the enhanced permeability and retention (EPR) effect (Fig. 18.10). A large part of solid tumors possesses a leaky vasculature, with an enhanced permeability to increase the supply of nutrients and oxygen necessary for their rapid growth (Fang et al., 2011). The fenestrations in the blood vessel endothelium of the solid tumor tissue have a diameter range from approximately 200 to 800 nm, allowing the crossing and the accumulation of nano-sized polyplexes from the bloodstream to the tumor site (Yuan et al., 1995). The accumulation is also favored by the poor lymphatic clearance and slow venous return in tumor tissues. After a few days, this phenomenon leads to an increase from 10- to 50-fold of nanoparticles concentration in the tumor (Iyer et al., 2006).

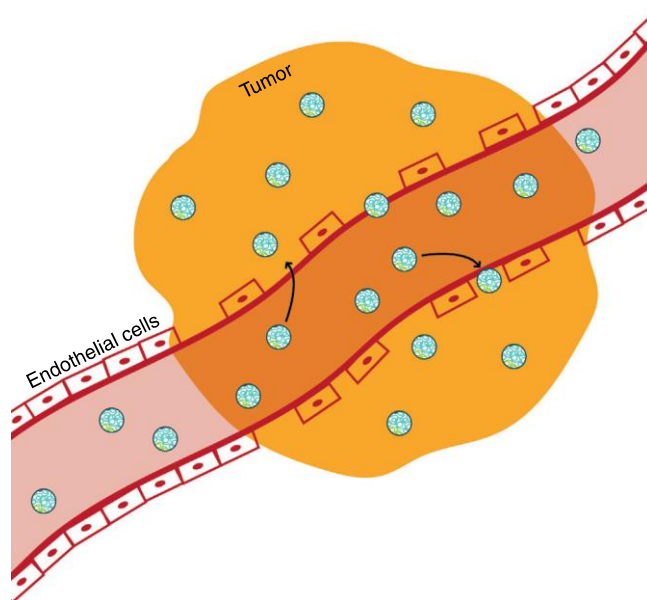


FIGURE 18.10 Passive targeting: enhanced permeability and retention effect (EPR effect).

7.2 Active Targeting

Active targeting involves the grafting of ligands specific to receptors overexpressed on the membrane of cancerous cells or angiogenic endothelial cells, such as antibody, peptide, aptamer, (poly)saccharide, and folic acid, onto the surface of the polyplex. The presence of these specific ligands might increase retention and accumulation at the tumor tissue, and can allow a selective and efficient cellular uptake (Zhong et al., 2014). Many studies have demonstrated better efficiency of ligand-directed active targeting nanoparticles, as compared to passively targeted nanoparticles that exploit the EPR effect, in cancer therapy (Fig. 18.11). In addition to the size, shape, and stability of polyplexes, the efficacy depends also on the nature, density, and affinity for the targeting ligand receptor (Nicolas et al., 2013; Koo et al., 2011). Active targeting is usually obtained by grafting the ligands on the terminal of PEG chains. Different kinds of ligands are actually used. Proteins, such as antibodies, lactoferrin, and transferrin have been largely used in the last years. Antibodies are the most used because of their high specificity and affinity with the corresponding antigen. For example, two tyrosine kinase receptors—human epidermal receptor 2 (HER2) and epidermal growth factor receptor (EGFR)—are overexpressed in many types of cancer, and they are an attractive target (Danhier et al., 2010). Lactoferrin is an iron-binding protein able to interact with the low-density lipoprotein receptor. This ligand is used as a specific targeting moiety for the passage of the blood–brain

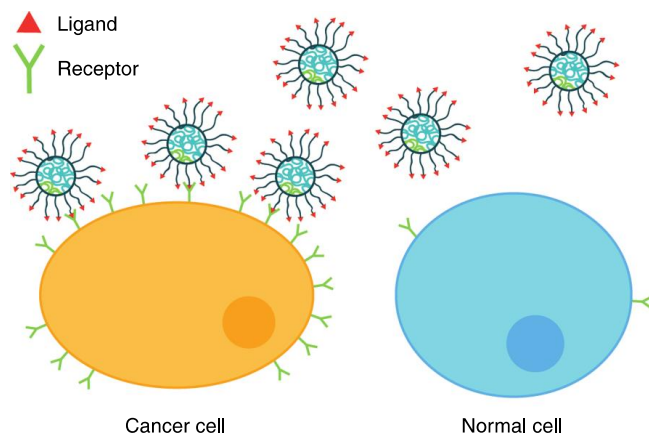


FIGURE 18.11 Active targeting.

barrier into the brain because of the overexpression of the receptor in glioma cells (Pang et al., 2010). Transferrin is another iron-binding protein, whose role is to transport iron in proliferating cells. The transferrin receptor is overexpressed in cancer cells, up to 100-fold, and is thus an attractive target (Qian et al., 2002). Aptamers, another kind of ligand, are RNA or single-stranded DNA possessing a high specificity and affinity like antigens, but with a smaller size (Xiao and Farokhzad, 2012). A10 aptamer, for example, recognizes specifically the extracellular domain of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) (Gu et al., 2008). Peptides are also used as ligands. They have the advantage of being smaller than the proteins described earlier, and thus, they have a lesser effect on the physicochemical characteristics of polyplexes (Ruoslahti, 2012). The most used peptide is cRGD (for cyclic Arg-Gly-Asp), one that shows high affinity for the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor, which is overexpressed in many types of solid tumors tissues as well as endothelial cells (Desgrosellier and Cheresch, 2010).

Toward (poly)saccharides, galactose residue can be used to target nanoparticles for the treatment of hepatocellular carcinoma because in this type of tumor cell, the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R), which binds galactose, is overexpressed. Nanoparticles functionalized with galactose are more strongly internalized from the liver tumor cells than nanoparticles without the (poly)saccharide on their surface (Zhong et al., 2013).

Finally, small molecules like folic acid (vitamin B9) can be used as targeting agents in cancer therapy. Folic acid is essential for the synthesis of purines and pyrimidines bases. Because of the high replication rate of malignant cells, the folic acid receptor is overexpressed in these cells. The high affinity of folic acid for its receptor and the inexpensive, nontoxic, nonimmunogenic, and readily available nature of this molecule make folate a ligand of choice for the preparation of anticancer nanoparticles (Zhong et al., 2014; Wang et al., 2013).

8 Endocytosis

Once the tumor tissue is reached, polyplexes have to enter into the target cells by endocytosis. Nanoparticles can exploit different pathways of endocytosis, a process not fully understood until recently. Endocytosis depends on the cell type and the characteristics of the polyplex, like size, shape, and charge. These mechanisms employed by nanomedicines for cellular uptake include, principally, phagocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, and clathrin- and caveolae-independent endocytosis (Sahay et al., 2010).

8.1 Phagocytosis

Among endocytosis mechanisms, phagocytosis occurs principally in professional phagocytes of the immune system, like macrophages, neutrophils, monocytes, and dendritic cells. But other cell types can also show some phagocytic activity, such as fibroblast, epithelial, and endothelial cells, even if at a lower amount (Hillaireau and Couvreur, 2009). For this reason, phagocytosis is rarely used in target cells, but is almost exclusively used by immune cells to degrade polyplexes recognized as foreign material.

8.2 Clathrin-Mediated Endocytosis

Clathrin-mediated endocytosis (CME) is a mechanism highly present and active in all mammalian cells, and it is the most used route for cellular entry. For example, it allows the uptake of cholesterol present in low-density lipoprotein (LDL) via the LDL receptor, or the uptake of iron, carried by transferrin and endocytosed via the transferrin receptor (Sahay et al., 2010). This pathway can also be used without receptors. Clathrin is a triskelion-shaped protein composed of three clathrin heavy chains and three light chains, which assemble into a polygonal mesh forming a coated pit around 150 nm in the plasma membrane. After this assembly, dynamin is recruited to mediate the membrane fusion and the formation of a clathrin-coated vesicle, followed by the uncoating and recycling of clathrin units. Then, the formed vesicle delivers its cargo to early endosomes, which are acidified by ATPase proton pumps to pH ~6. This early endosome matures in a late endosome (pH ~5), and then in a lysosome after fusion with prelysosomal vesicles containing hydrolytic enzymes, which are active in acidic pH, in order to degrade the internalized content (Hillaireau and Couvreur, 2009).

8.3 Caveolae-Mediated Endocytosis

Caveolae-mediated endocytosis (CavME) is a mechanism abundantly exploited by endothelial cells, fibroblasts, and adipocytes; yet, it is absent in neurons and leukocytes. Caveolae, a type of lipid-raft, are plasma membrane domains enriched with cholesterol and possessing a definite morphology (membrane invagination of 60–80 nm); they are characterized by the presence of specific proteins: caveolins (located in the membrane) and cavins (located in the cytoplasm). Until recently, the process of caveolae-mediated

endocytosis was not clearly understood, and was a contentious subject. Today, a consensus seems to emerge. As in the CME, dynamin helps in the membrane fusion and in the formation of the caveolae vesicle. Most of the time, this vesicle follows the same pathway as the clathrin-coated vesicle: early endosome, late endosome, then lysosome and potential degradation (Rewatkar et al., 2015). But in some cases, this pathway would seem to bypass lysosome and avoid degradation, and thus could be beneficial for the delivery of sensitive material like siRNA (Carver and Schnitzer, 2003).

8.4 Clathrin- and Caveolae-Independent Endocytosis

Finally, clathrin- and caveolae-independent endocytosis probably encompasses more than one pathway, but the mechanism remains poorly understood. These pathways would begin from lipid-rafts, different from caveolae, of 40–50 nm in diameter, and are able to be internalized in an endocytic vesicle (Conner and Schmid, 2003) (Fig. 18.12). It seems that

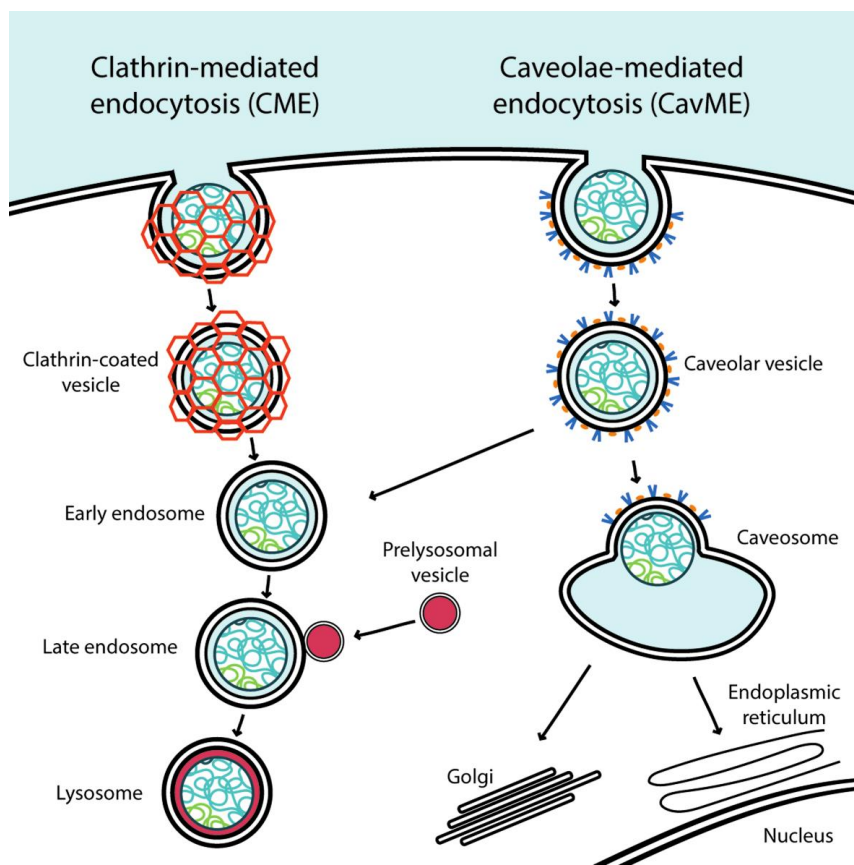


FIGURE 18.12 Clathrin- and caveolae-mediated endocytosis pathways.

clathrin- and caveolae-independent endocytosis requires specific lipid composition and is cholesterol dependent (Sahay et al., 2010).

8.5 Fluorescent-Activated Cell Sorting

To assess whether the polyplexes are well endocytosed and to determine the percentage of transfected cells, different techniques are used. First, fluorescent-activated cell sorting (FACS) is a method of flow cytometry where cells are sorted according to different fluorescence, and light scattering of each cell analyzed (Fig. 18.13). FACS will sort each cell according to their fluorescence intensity, which is dependent on the quantity of fluorescent siRNA internalized. The analysis can measure the percentage of transfected cells and their mean fluorescent intensity (MFI), giving an idea of the quantity of siRNA uptaken by cell (Lechanteur et al., 2015).

The use of a confocal microscope is another technique that visualizes fluorescently labeled siRNA directly into cells, and gives information about the intracellular localization. This technique gives qualitative data while FACS gives more quantitative results (Tai et al., 2015).

To understand the endocytosis pathway polyplexes use to enter into the cells, two methods of research exist: exclusion and colocalization studies.

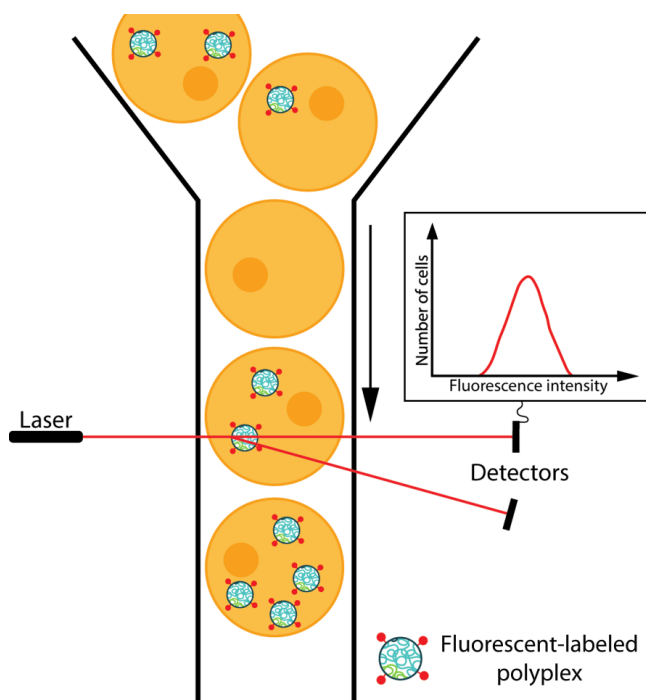


FIGURE 18.13 Principle of fluorescence-activated cell sorting (FACS).

8.6 Exclusion Studies

Exclusion studies consist in the selective inhibition of one or several pathways and the quantification of the remaining uptake by FACS analysis. Chlorpromazine, low potassium, and hypertonic medium, for example, dissociate clathrin from the plasma membrane; genistein inhibits one of the caveolin proteins (Cav1); filipin and nystatin bind the cholesterol in plasma membrane; cyclodextrins extract cholesterol out of plasma membrane; and dynasore inhibits dynamin role in the membrane fusion. However, the role of these inhibitors is poorly characterized, nonspecific, and cell-type dependent, making the evaluation of the obtained results difficult (Vercauteren et al., 2012; Ivanov, 2008). Better specific inhibition can be obtained by the shutdown of a protein essential for the proceedings of a specific pathway, for example, by introducing mutant proteins, analogous of the targeted protein. Another way is the use of siRNA in targeting an essential protein, which is administered using a commercial transfection reagent (Vercauteren et al., 2012).

8.7 Colocalization Studies

Colocalization studies consist of the staining of an endogenous protein or a ligand specific for a determined pathway, such as caveolin1 and proteins of the Rab family. Using fluorescent-labeled polyplexes and a confocal microscope, nanovectors and marked proteins or ligands can be localized into the cells. Colocalization of both fluorophores indicates the entry by the marked pathway (Vercauteren et al., 2012).

9 Endosomal Escape

After the endocytosis by targeted cells, nanovectors have to escape from the endosome to reach the cytoplasm and avoid the degradation by lysosomal enzymes. This is one of the crucial steps in the siRNA delivery. Different strategies can be implemented, like the disruption of the endosomal membrane using the pH-buffering effect of protonable groups (the proton sponge effect), or fusion with the lipid bilayer (Varkouhi et al., 2011).

Fusion with the lipid bilayer is mainly used by lipid nanoparticles, like liposomes. Membranes of both the endosome and the liposome fuse into one membrane, and the content of the nanoparticles is released into the cytoplasm. The fusion can be promoted by the presence of fusogenic peptides grafted on the nanovectors surface. At an acidic pH, fusogenic peptides interact with the membrane and induce fusion with the liposome (Hatakeyama et al., 2009).

For polymeric nanoparticles, the most used strategy is “the proton sponge effect” (Fig. 18.14). Weak bases (with pK_a between 5 and 8) present on the polymer structure, such as morpholine and histamine can be protonated during the acidification occurring in the endosome. The buffer capacity of the polymer will capture protons (H^+) coming by the ATPase proton pump activity. To keep a neutral charge balance, chlorine ions (Cl^-) will follow the entrance of protons, followed by the diffusion of water inside the endocytic vesicle by osmosis.

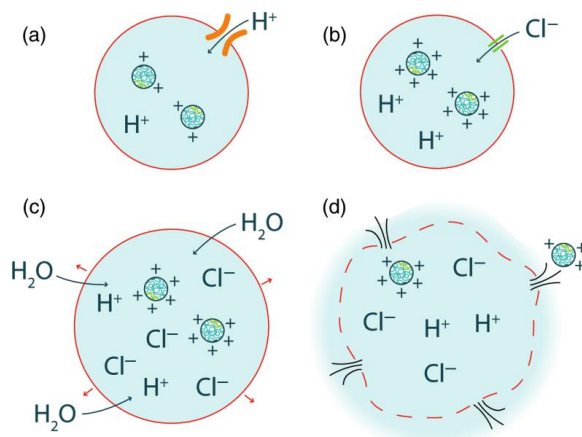


FIGURE 18.14 “The proton sponge effect,” used by polyplexes to escape from the endosome. (a) Protons are coming by the ATPase proton pump to acidify the endosome. (b) Protons are captured by the buffer capacity of the polymer, and chlorine ions follow the entrance of protons to keep the charge balance. (c) Water diffuses inside the endosome by osmosis. (d) Polymers with a high buffer capacity will capture enough protons to attract a sufficient quantity of water, which, consequentially, causes the burst of the endosome and the release of its content into the cytoplasm.

Polymers with a high buffer capacity will capture enough protons to attract a sufficient quantity of water that, consequentially, causes the burst of the endosome and the release of its content in the cytoplasm (Yousefi et al., 2013; Xiang et al., 2012; van der Aa et al., 2011).

The buffer capacity can be evaluated by acid–base titration, which involves comparing the tested polymer with a well-known polymer like PEI. Titration is performed from pH 7.4 to pH 5.1 using HCl or from pH 5.1 to pH 7.4 using NaOH. These pH values correspond to the pH variation occurring from the early endosome to the lysosome. The volume of HCl or NaOH necessary to reach the targeted pH is directly related to the buffer capacity of the polymer (Frère et al., 2015; Wang et al., 2013).

Buffer capacity can also be increased afterward by coincubating buffering compounds with nanovectors on the cells, or by adding them after the uptake. For example, the unprotonated form of chloroquine can diffuse into endosomes. With the decrease of the pH, chloroquine becomes protonated and trapped into the vesicle, helping the polyplex to escape and filling the role of “proton sponge” (Wytrwal et al., 2014).

To explore the endosomal escape mechanism of nanovectors, different techniques have been developed (Martens et al., 2014). The integrity of the endosomal membrane can be investigated using fluorescent molecules that are quenched inside the endocytic vesicle and become fluorescent once released. For example, calcein fluorescence is quenched into the endosome. After the endosomal escape, the intensity of fluorescence of calcein increases. Leakage leading to this increased fluorescence can be followed and visualized by microscopy (Bonner et al., 2011) and measured by FACS (Salomone et al., 2012). The rupture of the endosome can also be visualized using self-quenching, fluorescently labeled siRNA: the fluorescence is quenched when concentrated into the endosome. Using

live-cell video imaging, the release of siRNA into the cytoplasm is clearly visible as a burst of fluorescence toward the cytosol (Rehman et al., 2013). To get an idea of the intracellular localization of polyplexes, colocalization studies can be exploited. Specific markers of the lysosome can be used for this purpose, such as fluorescent markers of the lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) (Basha et al., 2011). Moreover, dyes that accumulate preferentially into the lysosome, such as LysoTracker, are frequently used. This dye is a weak base, which accumulates in an acidic compartment. However, due to its weak base properties, caution should be used as it might influence the endosomal acidification. The manufacturer's instructions have to be followed carefully (Martens et al., 2014). The colocalization of lysosome and polyplexes indicates the presence of the nanoparticles in the vesicles. On the other hand, absence of colocalization means a successful escape.

Electronic microscopy is an alternative to fluorescent microscopy, as it gives a higher resolution; however, fixed samples on the sample support are needed. TEM images allow the localization of nanoparticles in the cytoplasm or sequestered in the endocytic vesicle (Bieber et al., 2002). Finally, endosomal escape can be deduced measuring the effective knockdown due to the release of siRNA in the cytoplasm (Section 11).

10 Release of the siRNA From the Polyplexes

Once polyplexes escaped from the endosome, they are located into the cytoplasm. To be effective, the siRNA have to dissociate from the polymer to be able to associate with the RISC complex and degrade the targeted mRNA. The acidification process endured by polyplexes in the endosome can destabilize polyplexes and favor the release of siRNA. Moreover, biodegradable polymer should be degraded in monomers under the action of enzymes and set the siRNA free. To improve the degradation of the polymer in an intracellular environment, disulfide bonds (—S—S—) can be introduced in the polymer structure to take advantage of the reducing nature of the intracellular environment compared to the oxidative nature of the extracellular environment. The disulfide bond of bioreducible polymers can be degraded preferentially in the cytoplasm through thiol-disulfide exchange reactions caused by the high intracellular level of glutathione. The concentration of glutathione in the extracellular environment is 50–1000 times lower, reducing greatly the kinetics of the degradation (Lee and Kim, 2014; Son et al., 2012; Tai et al., 2015).

11 mRNA Degradation and Protein Shutdown

When free siRNA is in the cytoplasm, it can finally fulfill its role in the degradation of the targeted mRNA, and thus decrease the expression of the corresponding protein. To determine if the siRNA is efficiently administered, different techniques exist.

First, the targeted mRNA can be quantified by real-time RT-qPCR (real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) (Tang et al., 2015). With this technique, it is possible to determine the relative expression of a specific mRNA, as compared

to a control condition (semiquantitative method), or determine the number of mRNA copies using a calibration curve. For the relative expression, the relative quantity of mRNA in cells treated with polyplexes is compared to the mRNA amount in untreated cells or in cells treated with polyplexes containing a control siRNA. Using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method described by [Livak and Schmittgen \(2001\)](#), a percentage of mRNA expression compared to the control condition is obtained.

To observe the decrease in protein expression following the mRNA degradation, the most used method is the Western blot. This semiquantitative method allows a specific protein expression of a treated sample to be compared with a control sample ([Towbin et al., 1979](#); [Zheng et al., 2013](#)). If proteins are present at the cell membrane surface, FACS can also be used to quantify the expression after the staining of the protein ([Kato et al., 2011](#)). For secreted protein, their expression can be evaluated using ELISA.

The efficiency of polyplexes can also be determined using siRNA targeting luciferase. Cells modified to express luciferase produce green light in a medium containing luciferin, due to the reaction catalyzed by this enzyme. This reaction consists of the formation of oxyluciferin and green light from luciferin. Emitted green light can be measured using FACS or a luminometer. In the cells treated with siRNA targeting luciferase, the expression of this protein decreases if the delivery is effective. The decrease of expression leads to a decrease of green light intensity, which is easily measurable ([Tai et al., 2015](#)). This method is useful to evaluate the efficiency of a polymeric vector.

Finally, the best way to determine the efficacy of polyplexes is to observe the final biological response. If the decrease of the targeted protein expression is known to result in a biological effect (decrease of tumor volume, reduction of angiogenesis, etc.), this effect could be observed in cells or mice treated with the polyplexes formulation ([Majumder et al., 2014](#)).

12 Nanotoxicity

To reach the market, nanotherapeutics need to be safe for the patient. In addition to the nature of the polymeric vector and the active ingredient, the toxicity of the nanomaterial can be influenced by several parameters. Among these, we may cite the size, shape, surface properties, and route of exposure. Nanotoxicology is much more complicated than classical toxicology, and different specific tests have to be performed to evaluate the toxicity of nanotherapeutics on different organs, as well as on the blood and other body systems ([Xue et al., 2014](#); [Kolter et al., 2015](#)).

13 Conclusions

The delivery of siRNA to target tumor cells is one of the greatest challenges of the pharmaceutical technology. Currently, no anticancerous therapy based on polymeric delivery of siRNA exists on the market. However, many research teams are still working worldwide to achieve this objective.

There are many obstacles to overcome during the formulation of a siRNA delivery system, and many parameters must be taken into account during the design of a new nanovector. Physicochemical characteristics like the amount of siRNA incorporated, size of the nanoparticle, and its zeta potential are hardly dependent on the structure of the polymer, the N/P ratio, and the buffer. Stability can be significantly increased by using lyophilization or by adding a PEG corona around the nanoparticle.

After administration in the systemic circulation, polyplexes have to resist the immune system and the degradation of the siRNA by nucleases. PEGylation is one of the most used strategies to prepare “stealth” polyplexes capable of resisting the degradation done by the immune system and, consequently, increasing the nanovector half-life in the bloodstream. Despite the numerous advantages, this technique presents some drawbacks. The first problem is known as the PEG dilemma: PEGylation decreases the cellular uptake and the endosomal escape. Second, injection of PEG can induce the formation of anti-PEG IgM, leading to the onset of the ABC phenomenon of PEGylated particles, after the first parenteral administration. To avoid these drawbacks, many studies are ongoing to optimize the PEGylation technique or to find other alternatives to it.

To achieve a selective accumulation of siRNA in the tumor, two targeting strategies exist: passive and active targeting. Passive targeting exploits the leaky vasculature of tumors and the nanometer scale size of polyplexes, whereas active targeting requires the grafting of ligands on the surface of the particle, and is capable of selectively interacting with specific receptors on the cellular membrane of the target cells.

Once at the tumor site, polyplexes must enter into cells by endocytosis and escape from the endosome to reach the cytoplasm. The endosomal escape is a critical step in the siRNA delivery, and different strategies exist to achieve it, like the “proton sponge effect,” which uses the buffer capacity of polymers.

Entering the cytoplasm, the siRNA can dissociate from the polyplex, for example, with the help of bioreducible disulfide bonds in the polymer structure. This enables the siRNA to finally degrade the targeted mRNA, resulting in the shutdown of the desired protein.

Toxicity is one of the major obstacles for human use. Strategies to reduce as much as possible the potential nanotoxicity of polyplexes must be developed. Short- and long-term effects of these new medicines should be evaluated in depth before placing the treatment on the market (Xue et al., 2014).

Acknowledgment

The authors would like to thank Claudio Palazzo and Reatul Karim for their help during the redaction.

Abbreviations

ABC	Accelerated blood clearance
AFM	Atomic force microscopy

ASGP-R	Asialoglycoprotein receptor
CavME	Caveolae-mediated endocytosis
CME	Clathrin-mediated endocytosis
CR	Capillary electrophoresis
DLS	Dynamic light scattering
DSPE	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor
EMA	European Medicines Agency
EPR	Enhanced permeability and retention
FACS	Fluorescent-activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FFF	Field flow fractionation
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER2	Human epidermal receptor 2
IV	Intravenous
LDL	Low density lipoprotein
LDV	Laser Doppler velocimetry
LPLD	Lipoprotein lipase deficiency
MMP	Matrix metalloproteinase
MPS	Mononuclear phagocytic system
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NTA	Nanoparticle tracking analysis
PAMAM	Poly(amidoamine)
PC	Polycarbonate
PCL	Polycaprolactone
PCS	Photon correlation spectroscopy
PDI	Polydispersity index
PDMAEMA	Poly(dimethylaminoethyl methacrylate)
PEG	Polyethylene glycol
PEI	Polyethylenimine
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly(lactic- <i>co</i> -glycolic acid)
PLL	Poly-L-lysine
PMA	Poly(methacrylate)
PPG	Poly(propylene glycol)
PSMA	Prostate specific membrane antigen
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	Ribonucleic acid interference
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SEM	Scanning electron microscopy
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
ssRNA	Single-stranded ribonucleic acid
TEM	Transmission electron microscopy
TMC	Trimethyl chitosan
WHO	World Health Organization

References

- Abu Lila, A.S., Kiwada, H., Ishida, T., 2013. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. *J. Control. Release* 172, 38–47.
- Aggarwal, P., Hall, J.B., Mcleland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., Mcneil, S.E., 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 428–437.
- Bansal, R., Singh, A.K., Gandhi, R.P., Pant, A.B., Kumar, P., Gupta, K.C., 2014. Galactomannan-PEI based non-viral vectors for targeted delivery of plasmid to macrophages and hepatocytes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 461–471.
- Barenholz, Y., 2012. Doxil(R)—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release* 160, 117–134.
- Barua, S., Mitragotri, S., 2014. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: a review of current status and future prospects. *Nano Today* 9, 223–243.
- Basha, G., Novobrantseva, T.I., Rosin, N., Tam, Y.Y., Hafez, I.M., Wong, M.K., Sugo, T., Ruda, V.M., Qin, J., Klebanov, B., Ciufolini, M., Akinc, A., Tam, Y.K., Hope, M.J., Cullis, P.R., 2011. Influence of cationic lipid composition on gene silencing properties of lipid nanoparticle formulations of siRNA in antigen-presenting cells. *Mol. Ther.* 19, 2186–2200.
- Beck-Broichsitter, M., Nicolas, J., Couvreur, P., 2015. Design attributes of long-circulating polymeric drug delivery vehicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97, 304–317.
- Bertrand, N., Leroux, J.C., 2012. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. *J. Control. Release* 161, 152–163.
- Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A., Elsasser, H.-P., 2002. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine–DNA complexes. *J. Control. Release* 82, 441–454.
- Bonner, D.K., Leung, C., Chen-Liang, J., Chingozha, L., Langer, R., Hammond, P.T., 2011. Intracellular trafficking of polyamidoamine-poly(ethylene glycol) block copolymers in DNA delivery. *Bioconjug. Chem.* 22, 1519–1525.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7297–7301.
- Brocchini, S., Godwin, A., Balan, S., Choi, J.W., Zloh, M., Shaunak, S., 2008. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 3–12.
- Carver, L.A., Schnitzer, J.E., 2003. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat. Rev. Cancer* 3, 571–581.
- Cavallaro, G., Licciardi, M., Amato, G., Sardo, C., Giammona, G., Farra, R., Dapas, B., Grassi, M., Grassi, G., 2014. Synthesis and characterization of polyaspartamide copolymers obtained by ATRP for nucleic acid delivery. *Int. J. Pharm.* 466, 246–257.
- Chen, D., Liu, W., Shen, Y., Mu, H., Zhang, Y., Liang, R., Wang, A., Sun, K., Fu, F., 2011. Effects of a novel pH-sensitive liposome with cleavable esterase-catalyzed and pH-responsive double smart mPEG lipid derivative on ABC phenomenon. *Int. J. Nanomed.* 6, 2053–2061.
- Chen, W., Meng, F., Cheng, R., Deng, C., Feijen, J., Zhong, Z., 2014. Advanced drug and gene delivery systems based on functional biodegradable polycarbonates and copolymers. *J. Control. Release* 190, 398–414.
- Cheng, C., Convertine, A.J., Stayton, P.S., Bryers, J.D., 2012. Multifunctional triblock copolymers for intracellular messenger RNA delivery. *Biomaterials* 33, 6868–6876.
- Conner, S.D., Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44.

- Cun, D., Jensen, D.K., Maltesen, M.J., Bunker, M., Whiteside, P., Scurr, D., Foged, C., Nielsen, H.M., 2011. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 26–35.
- Damodaran, V.B., Fee, C.J., Ruckh, T., Papat, K.C., 2010. Conformational studies of covalently grafted poly(ethylene glycol) on modified solid matrices using X-ray photoelectron spectroscopy. *Langmuir* 26, 7299–7306.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Preat, V., 2012. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161, 505–522.
- Danhier, F., Feron, O., Preat, V., 2010. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release* 148, 135–146.
- Dehousse, V., Garbacki, N., Colige, A., Evrard, B., 2010. Development of pH-responsive nanocarriers using trimethylchitosans and methacrylic acid copolymer for siRNA delivery. *Biomaterials* 31, 1839–1849.
- Desgrosellier, J.S., Cheresh, D.A., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10, 9–22.
- Diaz-Lopez, R., Libong, D., Tsapis, N., Fattal, E., Chaminade, P., 2008. Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluorooctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 702–707.
- Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., Saigo, K., 2003. Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr. Biol.* 13, 41–46.
- Dominska, M., Dykxhoorn, D.M., 2010. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J. Cell Sci.* 123, 1183–1189.
- Dong, D.W., Xiang, B., Gao, W., Yang, Z.Z., Li, J.Q., Qi, X.R., 2013. pH-responsive complexes using prefunctionalized polymers for synchronous delivery of doxorubicin and siRNA to cancer cells. *Biomaterials* 34, 4849–4859.
- Duncan, R., Gaspar, R., 2011. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* 8, 2101–2141.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498.
- Endres, T., Zheng, M., Beck-Broichsitter, M., Kissel, T., 2012. Lyophilised ready-to-use formulations of PEG-PCL-PEI nano-carriers for siRNA delivery. *Int. J. Pharm.* 428, 121–124.
- Endres, T., Zheng, M., Kilic, A., Turowska, A., Beck-Broichsitter, M., Renz, H., Merkel, O.M., Kissel, T., 2014. Amphiphilic biodegradable PEG-PCL-PEI triblock copolymers for FRET-capable in vitro and in vivo delivery of siRNA and quantum dots. *Mol. Pharm.* 11, 1273–1281.
- Esfand, R., Tomalia, D.A., 2001. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* 6, 427–436.
- Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H., 2011. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 136–151.
- Favretto, M.E., Krieg, A., Schubert, S., Schubert, U.S., Brock, R., 2015. Multifunctional poly(methacrylate) polyplex libraries: a platform for gene delivery inspired by nature. *J. Control. Release* 209, 1–11.
- Filipe, V., Hawe, A., Jiskoot, W., 2010. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm. Res.* 27, 796–810.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.

534 NANOARCHITECTONICS FOR SMART DELIVERY AND DRUG TARGETING

- Florea, B.I., Meaney, C., Junginger, H.E., Borchard, G., 2002. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci.* 4, E12.
- Forbes, D.C., Peppas, N.A., 2014. Polymeric nanocarriers for siRNA delivery to murine macrophages. *Macromol. Biosci.* 14, 1096–1105.
- Frère, A., Kawalec, M., Tempelaar, S., Peixoto, P., Hendrick, E., Peulen, O., Evrard, B., Dubois, P., Mespouille, L., Mottet, D., Piel, G., 2015. Impact of the structure of biocompatible aliphatic polycarbonates on siRNA transfection ability. *Biomacromolecules* 16, 769–779.
- Gao, K., Huang, L., 2013. Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. *Acta Pharm. Sin.* B 3, 213–225.
- Gary, D.J., Min, J., Kim, Y., Park, K., Won, Y.Y., 2013. The effect of N/P ratio on the in vitro and in vivo interaction properties of PEGylated poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-based siRNA complexes. *Macromol. Biosci.* 13, 1059–1071.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1–9.
- Geihe, E.I., Cooley, C.B., Simon, J.R., Kiesewetter, M.K., Edward, J.A., Hickerson, R.P., Kaspar, R.L., Hedrick, J.L., Waymouth, R.M., Wender, P.A., 2012. Designed guanidinium-rich amphipathic oligocarbonate molecular transporters complex, deliver and release siRNA in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 13171–13176.
- Gu, F., Zhang, L., Teply, B.A., Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2008. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2586–2591.
- Guo, J., Cheng, W.P., Gu, J., Ding, C., Qu, X., Yang, Z., O'driscoll, C., 2012. Systemic delivery of therapeutic small interfering RNA using a pH-triggered amphiphilic poly-L-lysine nanocarrier to suppress prostate cancer growth in mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 521–532.
- Hama, S., Itakura, S., Nakai, M., Nakayama, K., Morimoto, S., Suzuki, S., Kogure, K., 2015. Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry. *J. Control. Release* 206, 67–74.
- Han, S., Cheng, Q., Wu, Y., Zhou, J., Long, X., Wei, T., Huang, Y., Zheng, S., Zhang, J., Deng, L., Wang, X., Liang, X.-J., Cao, H., Liang, Z., Dong, A., 2015a. Effects of hydrophobic core components in amphiphilic PDMAEMA nanoparticles on siRNA delivery. *Biomaterials* 48, 45–55.
- Han, L., Tang, C., Yin, C., 2013. Effect of binding affinity for siRNA on the in vivo antitumor efficacy of polyplexes. *Biomaterials* 34, 5317–5327.
- Han, L., Tang, C., Yin, C., 2015b. Dual-targeting and pH/redox-responsive multi-layered nanocomplexes for smart co-delivery of doxorubicin and siRNA. *Biomaterials* 60, 42–52.
- Hatakeyama, H., Akita, H., Kogure, K., Oishi, M., Nagasaki, Y., Kihira, Y., Ueno, M., Kobayashi, H., Kikuchi, H., Harashima, H., 2007. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Ther.* 14, 68–77.
- Hatakeyama, H., Ito, E., Akita, H., Oishi, M., Nagasaki, Y., Futaki, S., Harashima, H., 2009. A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo. *J. Control. Release* 139, 127–132.
- Hillaireau, H., Couvreur, P., 2009. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 2873–2896.
- Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1998. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4607–4612.
- Islam, M.A., Park, T.E., Singh, B., Maharjan, S., Firdous, J., Cho, M.H., Kang, S.K., Yun, C.H., Choi, Y.J., Cho, C.S., 2014. Major degradable polycations as carriers for DNA and siRNA. *J. Control. Release* 193, 74–89.

- Ivanov, A.I., 2008. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol. Biol.* 440, 15–33.
- Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J., Maeda, H., 2006. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* 11, 812–818.
- Janes, K.A., Calvo, P., Alonso, M.J., 2001. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 83–97.
- Jiskoot, W., Crommelin, D., 2005. *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*. AAPS Press, Arlington, VA.
- Kapoor, M., Burgess, D.J., 2013. Cellular uptake mechanisms of novel anionic siRNA lipoplexes. *Pharm. Res.* 30, 1161–1175.
- Kasper, J.C., Kuchler, S., Friess, W., 2013a. Lyophilization of synthetic gene carriers. *Methods Mol. Biol.* 948, 133–147.
- Kasper, J.C., Schaffert, D., Ogris, M., Wagner, E., Friess, W., 2011. Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability: a step closer from promising technology to application. *J. Control. Release* 151, 246–255.
- Kasper, J.C., Troiber, C., Kuchler, S., Wagner, E., Friess, W., 2013b. Formulation development of lyophilized, long-term stable siRNA/oligoaminoamide polyplexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 294–305.
- Kato, M., Chiba, T., Li, M., Hanyu, Y., 2011. Bioluminescence assay for detecting cell surface membrane protein expression. *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 31–39.
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., 2010. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 6288–6308.
- Kodama, Y., Nakamura, T., Kurosaki, T., Egashira, K., Mine, T., Nakagawa, H., Muro, T., Kitahara, T., Higuchi, N., Sasaki, H., 2014. Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 472–479.
- Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K., Akai, S., Ishii, T., Kenjo, E., Ishida, T., Kiwada, H., Tsukada, H., Oku, N., 2010. T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. Pharm.* 392, 218–223.
- Kolate, A., Baradia, D., Patil, S., Vhora, I., Kore, G., Misra, A., 2014. PEG: a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *J. Control. Release* 192C, 67–81.
- Kolter, M., Ott, M., Hauer, C., Reimold, I., Fricker, G., 2015. Nanotoxicity of poly(*n*-butylcyano-acrylate) nanoparticles at the blood–brain barrier, in human whole blood and in vivo. *J. Control. Release* 197, 165–179.
- Koo, H., Huh, M.S., Sun, I.-C., Yuk, S.H., Choi, K., Kim, K., Kwon, I.C., 2011. In vivo targeted delivery of nanoparticles for theranosis. *Acc. Chem. Res.* 44, 1018–1028.
- Lavigne, C., Slater, K., Gajanayaka, N., Duguay, C., Arnau Peyrotte, E., Fortier, G., Simard, M., Kell, A.J., Barnes, M.L., Thierry, A.R., 2013. Influence of lipoplex surface charge on siRNA delivery: application to the in vitro downregulation of CXCR4 HIV-1 co-receptor. *Expert Opin. Biol. Ther.* 13, 973–985.
- Lechanteur, A., Furst, T., Evrard, B., Delvenne, P., Hubert, P., Piel, G., 2015. Development of anti-E6 pegylated lipoplexes for mucosal application in the context of cervical preneoplastic lesions. *Int. J. Pharm.* 483, 268–277.
- Lee, J.S., Bae, J.W., Joung, Y.K., Lee, S.J., Han, D.K., Park, K.D., 2008. Controlled dual release of basic fibroblast growth factor and indomethacin from heparin-conjugated polymeric micelle. *Int. J. Pharm.* 346, 57–63.
- Lee, S.Y., Huh, M.S., Lee, S., Lee, S.J., Chung, H., Park, J.H., Oh, Y.K., Choi, K., Kim, K., Kwon, I.C., 2010. Stability and cellular uptake of polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) complexes for efficient gene silencing. *J. Control. Release* 141, 339–346.
- Lee, Y.S., Kim, S.W., 2014. Bioreducible polymers for therapeutic gene delivery. *J. Control. Release* 190, 424–439.

- Li, C., Wallace, S., 2008. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 886–898.
- Li, Y., Wang, J., Wientjes, M.G., Au, J.L., 2012. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 29–39.
- Lim, H., Noh, J., Kim, Y., Kim, H., Kim, J., Khang, G., Lee, D., 2013. Acid-degradable cationic poly(ketal amidoamine) for enhanced RNA interference in vitro and in vivo. *Biomacromolecules* 14, 240–247.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, T., Zhang, Y., Xue, W., 2012. Interactions between solubilized polymer molecules and blood components. *J. Control. Release* 160, 14–24.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* 65, 271–284.
- Majumder, P., Bhunia, S., Bhattacharyya, J., Chaudhuri, A., 2014. Inhibiting tumor growth by targeting liposomally encapsulated CDC20siRNA to tumor vasculature: therapeutic RNA interference. *J. Control. Release* 180C, 100–108.
- Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W., Duncan, R., 2000. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* 65, 133–148.
- Malvern Instruments Ltd, 2013. Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern Instruments Ltd, Worcestershire.
- Martens, T.F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S.C., Braeckmans, K., 2014. Intracellular delivery of nanomaterials: how to catch endosomal escape in the act. *Nano Today* 9, 344–364.
- Matsumoto, M., Matsusaki, M., Akashi, M., 2014. Preparation of biodegradable peptide nanospheres with hetero PEG brush surfaces. *Macromol. Biosci.* 14, 142–150.
- Mespouille, L., Coulembier, O., Kawalec, M., Dove, A.P., Dubois, P., 2014. Implementation of metal-free ring-opening polymerization in the preparation of aliphatic polycarbonate materials. *Prog. Polym. Sci.* 39, 1144–1164.
- Mishra, S., Webster, P., Davis, M.E., 2004. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur. J. Cell. Biol.* 83, 97–111.
- Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D., 1996. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12349–12354.
- Moghimi, S.M., Andersen, A.J., Ahmadvand, D., Wibroe, P.P., Andresen, T.L., Hunter, A.C., 2011. Material properties in complement activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1000–1007.
- Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G., Szewczyk, A., 2005. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol. Ther.* 11, 990–995.
- Morrison, C., 2015. \$1-million price tag set for Glybera gene therapy. *Nat. Biotechnol.* 33, 217–218.
- Mottet, D., Bellahcene, A., Pirote, S., Waltregny, D., Deroanne, C., Lamour, V., Lidereau, R., Castronovo, V., 2007. Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circ. Res.* 101, 1237–1246.
- Nelson, C.E., Kintzing, J.R., Hanna, A., Shannon, J.M., Gupta, M.K., Duvall, C.L., 2013. Balancing cationic and hydrophobic content of PEGylated siRNA polyplexes enhances endosome escape, stability, blood circulation time, and bioactivity in vivo. *ACS Nano* 7, 8870–8880.
- Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., Couvreur, P., 2013. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* 42, 1147–1235.

- Novo, L., Rizzo, L.Y., Golombek, S.K., Dakwar, G.R., Lou, B., Remaut, K., Mastrobattista, E., Van Nostrum, C.E., Jahnen-Dechent, W., Kiessling, F., Braeckmans, K., Lammers, T., Hennink, W.E., 2014. Decationized polyplexes as stable and safe carrier systems for improved biodistribution in systemic gene therapy. *J. Control. Release* 195, 162–175.
- Oh, Y.K., Park, T.G., 2009. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 850–862.
- Ong, Z.Y., Fukushima, K., Coady, D.J., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., 2011. Rational design of biodegradable cationic polycarbonates for gene delivery. *J. Control. Release* 152, 120–126.
- Owens, III, D.E., Peppas, N.A., 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93–102.
- Pang, Z., Feng, L., Hua, R., Chen, J., Gao, H., Pan, S., Jiang, X., Zhang, P., 2010. Lactoferrin-conjugated biodegradable polymersome holding doxorubicin and tetrandrine for chemotherapy of glioma rats. *Mol. Pharm.* 7, 1995–2005.
- Psut, G., Sergi, M., Veronese, E.M., 2008. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 69–78.
- Qian, Z.M., Li, H., Sun, H., Ho, K., 2002. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* 54, 561–587.
- Rabanel, J.M., Hildgen, P., Banquy, X., 2014. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *J. Control. Release* 185, 71–87.
- Ragelle, H., Colombo, S., Pourcelle, V., Vanvarenberg, K., Vandermeulen, G., Bouzin, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., Foged, C., Preat, V., 2015. Intracellular siRNA delivery dynamics of integrin-targeted, PEGylated chitosan-poly(ethylene imine) hybrid nanoparticles: a mechanistic insight. *J. Control. Release* 211, 1–9.
- Ragelle, H., Vandermeulen, G., Preat, V., 2013. Chitosan-based siRNA delivery systems. *J. Control. Release* 172, 207–218.
- Rasolonjatovo, B., Gomez, J.P., Meme, W., Goncalves, C., Huin, C., Bennevault-Celton, V., Le Gall, T., Montier, T., Lehn, P., Cheradame, H., Midoux, P., Guegan, P., 2014. Poly(2-methyl-2-oxazoline)-*b*-poly(tetrahydrofuran)-*b*-poly(2-methyl-2-oxazoline) amphiphilic triblock copolymers: synthesis, physicochemical characterizations and hydrosolubilizing properties. *Biomacromolecules* 16, 748–756.
- Rehman, Z.U., Hoekstra, D., Zuhorn, I.S., 2013. Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS Nano* 7, 3767–3777.
- Reschner, A., Shim, Y.H., Dubois, P., Delvenne, P., Evrard, B., Marcelis, L., Moucheron, C., Kirsch-De Mesmaeker, A., Defrancq, E., Raes, M., Piette, J., Collard, L., Piel, G., 2013. Evaluation of a new biocompatible poly(*N*-(morpholino ethyl methacrylate)-based copolymer for the delivery of ruthenium oligonucleotides, targeting HPV16 E6 oncogene. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 1432–1440.
- Rewatkar, P.V., Parton, R.G., Parekh, H.S., Parat, M.O., 2015. Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 91, 92–108.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D., 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785–797.
- Ruoslahti, E., 2012. Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles. *Adv. Mater.* 24, 3747–3756.
- Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., 2010. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release* 145, 182–195.
- Salomone, E., Cardarelli, F., Di Luca, M., Boccardi, C., Nifosi, R., Bardi, G., Di Bari, L., Serresi, M., Beltram, F., 2012. A novel chimeric cell-penetrating peptide with membrane-disruptive properties for efficient endosomal escape. *J. Control. Release* 163, 293–303.

538 NANOARCHITECTONICS FOR SMART DELIVERY AND DRUG TARGETING

- Sanna, V., Pala, N., Sechi, M., 2014. Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *Int. J. Nanomed.* 9, 467–483.
- Singha, K., Namgung, R., Kim, W.J., 2011. Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic Acid Ther.* 21, 133–147.
- Siomi, H., Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396–404.
- Sokolova, V., Kozlova, D., Knuschke, T., Buer, J., Westendorf, A.M., Epple, M., 2013. Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells. *Acta Biomater.* 9, 7527–7535.
- Son, S., Namgung, R., Kim, J., Singha, K., Kim, W.J., 2012. Bioreducible polymers for gene silencing and delivery. *Acc. Chem. Res.* 45, 1100–1112.
- Steele, T.W., Zhao, X., Tarcha, P., Kissel, T., 2012. Factors influencing polycation/siRNA colloidal stability toward aerosol lung delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 14–24.
- Sugahara, S., Kajiki, M., Kuriyama, H., Kobayashi, T.R., 2007. Complete regression of xenografted human carcinomas by a paclitaxel-carboxymethyl dextran conjugate (AZ10992). *J. Control. Release* 117, 40–50.
- Tai, Z., Wang, X., Tian, J., Gao, Y., Zhang, L., Yao, C., Wu, X., Zhang, W., Zhu, Q., Gao, S., 2015. Biodegradable stearylated peptide with internal disulfide bonds for efficient delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Biomacromolecules* 16, 1119–1130.
- Tang, Y., Han, Y., Liu, L., Shen, W., Zhang, H., Wang, Y., Cui, X., Wang, Y., Liu, G., Qi, R., 2015. Protective effects and mechanisms of G5 PAMAM dendrimers against acute pancreatitis induced by caerulein in mice. *Biomacromolecules* 16, 174–182.
- Tekedereli, I., Alpay, S.N., Akar, U., Yuca, E., Ayugo-Rodriguez, C., Han, H.D., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G., Ozpolat, B., 2013. Therapeutic silencing of Bcl-2 by systemically administered siRNA nanotherapeutics inhibits tumor growth by autophagy and apoptosis and enhances the efficacy of chemotherapy in orthotopic xenograft models of ER (–) and ER (+) breast cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2, e121.
- Torchilin, V.P., 2014. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 813–827.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65, 87–108.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354.
- Troiber, C., Kasper, J.C., Milani, S., Scheible, M., Martin, I., Schaubhut, F., Kuchler, S., Radler, J., Simmel, E.C., Friess, W., Wagner, E., 2012. Comparison of four different particle sizing methods for siRNA polyplex characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 255–264.
- Tros De Iharduya, C., Sun, Y., Duzgunes, N., 2010. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 159–170.
- van der Aa, L.J., Vader, P., Storm, G., Schifflers, R.M., Engbersen, J.F., 2011. Optimization of poly(amido amine)s as vectors for siRNA delivery. *J. Control. Release* 150, 177–186.
- VandeVondele, S., Voros, J., Hubbell, J.A., 2003. RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 784–790.
- Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G., Haisma, H.J., 2011. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* 151, 220–228.
- Vercauteren, D., Rejman, J., Martens, T.F., Demeester, J., De Smedt, S.C., Braeckmans, K., 2012. On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: mechanisms and methods. *J. Control. Release* 161, 566–581.

- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2006. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27, 4356–4373.
- Walkey, C.D., Chan, W.C., 2012. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2780–2799.
- Wang, M., Hu, H., Sun, Y., Qiu, L., Zhang, J., Guan, G., Zhao, X., Qiao, M., Cheng, L., Cheng, L., Chen, D., 2013. A pH-sensitive gene delivery system based on folic acid-PEG-chitosan–PAMAM-plasmid DNA complexes for cancer cell targeting. *Biomaterials* 34, 10120–10132.
- Wang, C.F., Lin, Y.X., Jiang, T., He, F., Zhuo, R.X., 2009. Polyethylenimine-grafted polycarbonates as biodegradable polycations for gene delivery. *Biomaterials* 30, 4824–4832.
- Watanabe, N., Yano, K., Tsuyuki, K., Okano, T., Yamato, M., 2015. Re-examination of regulatory opinions in Europe: possible contribution for the approval of the first gene therapy product Glybera. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2, 14066.
- Weissig, V., Pettinger, T.K., Murdock, N., 2014. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int. J. Nanomed.* 9, 4357–4373.
- Wender, P.A., Galliher, W.C., Goun, E.A., Jones, L.R., Pillow, T.H., 2008. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 452–472.
- Wyrwal, M., Leduc, C., Sarna, M., Goncalves, C., Kepczynski, M., Midoux, P., Nowakowska, M., Pichon, C., 2014. Gene delivery efficiency and intracellular trafficking of novel poly(allylamine) derivatives. *Int. J. Pharm.* 478, 372–382.
- Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J.C., Jin, T., Dai, K., Zhang, X., 2012. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *J. Control. Release* 158, 371–378.
- Xiao, Z., Farokhzad, O.C., 2012. Aptamer-functionalized nanoparticles for medical applications: challenges and opportunities. *ACS Nano* 6, 3670–3676.
- Xue, H.Y., Liu, S., Wong, H.L., 2014. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine* 9, 295–312.
- Yang, C., Ong, Z.Y., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., 2011. Novel biodegradable block copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and cationic polycarbonate: effects of peg configuration on gene delivery. *Macromol. Rapid Commun.* 32, 1826–1833.
- Yousefi, A., Storm, G., Schifflers, R., Mastrobattista, E., 2013. Trends in polymeric delivery of nucleic acids to tumors. *J. Control. Release* 170, 209–218.
- Yu, H., Nie, Y., Dohmen, C., Li, Y., Wagner, E., 2011. Epidermal growth factor-PEG functionalized PAMAM-pentaethylenehexamine dendron for targeted gene delivery produced by click chemistry. *Biomacromolecules* 12, 2039–2047.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 1995. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 55, 3752–3756.
- Zhan, X., Tran, K.K., Shen, H., 2012. Effect of the poly(ethylene glycol) (PEG) density on the access and uptake of particles by antigen-presenting cells (APCs) after subcutaneous administration. *Mol. Pharm.* 9, 3442–3451.
- Zhao, Z.X., Gao, S.Y., Wang, J.C., Chen, C.J., Zhao, E.Y., Hou, W.J., Feng, Q., Gao, L.Y., Liu, X.Y., Zhang, L.R., Zhang, Q., 2012. Self-assembly nanomicelles based on cationic mPEG-PLA-*b*-Polyarginine(R15) triblock copolymer for siRNA delivery. *Biomaterials* 33, 6793–6807.
- Zheng, M., Librizzi, D., Kilic, A., Liu, Y., Renz, H., Merkel, O.M., Kissel, T., 2012. Enhancing in vivo circulation and siRNA delivery with biodegradable polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* 33, 6551–6558.
- Zheng, C., Zheng, M., Gong, P., Deng, J., Yi, H., Zhang, P., Zhang, Y., Liu, P., Ma, Y., Cai, L., 2013. Polypeptide cationic micelles mediated co-delivery of docetaxel and siRNA for synergistic tumor therapy. *Biomaterials* 34, 3431–3438.

540 NANOARCHITECTONICS FOR SMART DELIVERY AND DRUG TARGETING

- Zhong, Y., Meng, F., Deng, C., Zhong, Z., 2014. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules* 15, 1955–1969.
- Zhong, Y., Yang, W., Sun, H., Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Zhong, Z., 2013. Ligand-directed reduction-sensitive shell-sheddable biodegradable micelles actively deliver doxorubicin into the nuclei of target cancer cells. *Biomacromolecules* 14, 3723–3730.
- Zhou, L., Chen, Z., Wang, E., Yang, X., Zhang, B., 2013. Multifunctional triblock copolymer mP3/4HB-*b*-PEG-*b*-IPEI for efficient intracellular siRNA delivery and gene silencing. *Acta Biomater.* 9, 6019–6031.

OBJECTIFS ET PLAN DE THÈSE

Le travail abordé dans le cadre de cette thèse a pour objectif le développement d'une formulation à base de vecteurs polymères polycarbonates pour l'administration intraveineuse (IV) de siRNA dirigé contre des histones déacétylases (HDAC), comme nouvel outil thérapeutique dans le traitement du cancer.

Pour ce projet, les polymères de type polycarbonates aliphatiques ont été choisis pour la formulation de ces nanoparticules. Le Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC), de l'Université de Mons, a conçu et synthétisé les polymères polycarbonates, de structures et compositions variées. Il s'agit de polymères biodégradables et biocompatibles, dont la synthèse peut être réalisée en respectant certains principes de la « chimie verte ». Ce type de polymère permet de greffer au squelette toute une série de fonctions ainsi que d'obtenir de nombreuses architectures différentes, afin de concevoir un polymère idéal pour la délivrance de siRNA.

Les membres de la famille des HDAC sont considérés comme des cibles pertinentes en thérapie anticancéreuse. Il existe actuellement quatre inhibiteurs pharmacologiques à large spectre inhibant l'activité enzymatique des différents membres de la famille des HDAC. Ceux-ci sont reconnus par la FDA pour le traitement de patients souffrant de cancers hématologiques. L'inhibition sélective, grâce aux siRNA, d'une HDAC jouant un rôle prépondérant dans la biologie des cellules cancéreuses pourrait permettre de garder la même efficacité antitumorale tout en diminuant les effets non désirés. Au regard des précédents travaux réalisés au Laboratoire de Signalisation et Interactions des Protéines (PSI) et au Laboratoire de Recherche sur les Métastases (LRM), de l'Université de Liège, le choix du ciblage s'est porté sur les histones déacétylases HDAC5 ou HDAC7. En effet, l'inhibition spécifique d'HDAC5 dans les cellules cancéreuses bloque la prolifération cellulaire et diminue la croissance de la tumeur *in vivo*. D'autre part, HDAC7 joue un rôle important dans l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, nécessaires au développement, à la croissance et à la dissémination métastatique des tumeurs. L'utilisation de siRNA dirigé contre HDAC5 ou HDAC7 pourrait donc mener à un traitement antitumoral efficace en ciblant respectivement soit les cellules tumorales, soit les cellules endothéliales.

Les polymères fournis par le SMPC sont mis en œuvre au Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie (LTPB), Université de Liège. Les polyplexes sont caractérisés et leur formulation est optimisée afin d'obtenir des caractéristiques physico-chimiques adéquates. Une fois que la formulation des polyplexes semble optimale, leur efficacité est évaluée, *in vitro* et *in vivo*, au LRM et au PSI.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude de l'influence de la structure des polycarbonates, contenant des groupes fonctionnels guanidine et/ou morpholine, sur leur capacité à former des polyplexes aux caractéristiques physico-chimiques compatibles avec l'administration IV. L'objectif final de cette partie étant d'obtenir des polyplexes efficaces *in vitro*, capables *in fine* de diminuer l'expression de la protéine cible. Afin d'obtenir cette formulation, de nombreux polymères de structures et d'architectures différentes ont été testés.

Ces polyplexes étant capables de franchir les barrières intracellulaires nécessaires à leur efficacité, la deuxième partie de ce projet a permis de comparer ces polyplexes à des polyplexes PEGylés, afin d'évaluer leur capacité à administrer du siRNA par voie intraveineuse. Différents tests *in vitro* ont été réalisés afin d'évaluer le comportement des polyplexes en présence des constituants sanguins, ainsi qu'une étude de biodistribution *in vivo*.

Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés à une alternative à la PEGylation en testant l'effet de l'acide hyaluronique sur la transfection et l'efficacité des polyplexes. En plus de pouvoir augmenter la furtivité des polyplexes, l'acide hyaluronique pourrait permettre un ciblage actif grâce à son interaction avec le récepteur CD44.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. INFLUENCE DE LA STRUCTURE DES POLYCARBONATES ALIPHATIQUES SUR LEUR CAPACITÉ À FORMER DES POLYPLEXES AUX CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ADÉQUATES POUR L'INJECTION IV ET EFFICACES *IN VITRO*

Cette première partie s'intéresse au développement de polymères polycarbonates, capables de former des nanoparticules présentant des propriétés physico-chimiques requises pour une administration par la voie IV et permettant un ciblage passif de la tumeur. Pour y parvenir, la structure, la masse moléculaire et la composition des polymères polycarbonates ont été modifiées et différentes fonctions y ont été greffées.

Comme décrit dans la l'introduction, ces polymères doivent être capables de complexer le siRNA afin de former des polyplexes. Pour une utilisation par la voie IV, la taille idéale des nanoparticules se situe entre 50 à 300 nm [1], afin de permettre une accumulation des nanoparticules au niveau de la tumeur par l'effet EPR [2]. Au niveau de la charge de surface des polyplexes, celle-ci doit être de préférence légèrement positive, afin d'interagir avec les constituants anioniques des membranes plasmiques, tout en limitant la toxicité et l'interaction avec les protéines sanguines [3, 4].

Les paramètres physico-chimiques de complexation du siRNA, de taille et de charge sont évalués pour chaque polymère en fonction du rapport N/P, c'est-à-dire le rapport entre le nombre de fonctions amines (N), positivement ionisables, présentes sur la structure du polymère, et le nombre de fonctions phosphates (P) du siRNA [5]. Un rapport N/P optimal, auquel les polyplexes possèdent les meilleures caractéristiques physico-chimiques, est ainsi déterminé pour chaque polymère. De façon générale, avec l'augmentation du rapport N/P, l'incorporation du siRNA et la charge de surface augmentent progressivement pour atteindre un plateau (Figure I.1). L'incorporation passe de 0 % au N/P 0 (pas de polymère) pour atteindre des valeurs proches de 100 % à l'équilibre. Pour le potentiel zêta, celui-ci est négatif aux faibles rapports N/P à cause de l'excès de siRNA. Il augmente ensuite pour arriver à une charge de surface positive à l'équilibre. L'évolution de la taille en fonction du rapport N/P montre souvent un profil différent. Le diamètre augmente fortement aux faibles rapports N/P, en raison d'une faible force de cohésion entre les polymères et le siRNA, pour ensuite diminuer et également atteindre un plateau, lorsque le polymère ajouté en excès ne participe plus à la formation des polyplexes. Un rapport N/P optimal est ainsi déterminé pour chaque polymère. Il correspond à la quantité minimale de polymère nécessaire pour atteindre les valeurs à l'équilibre d'incorporation du siRNA, de taille et de charge de surface. Dans l'exemple donné à la Figure I.1, le rapport N/P optimal est de 40.

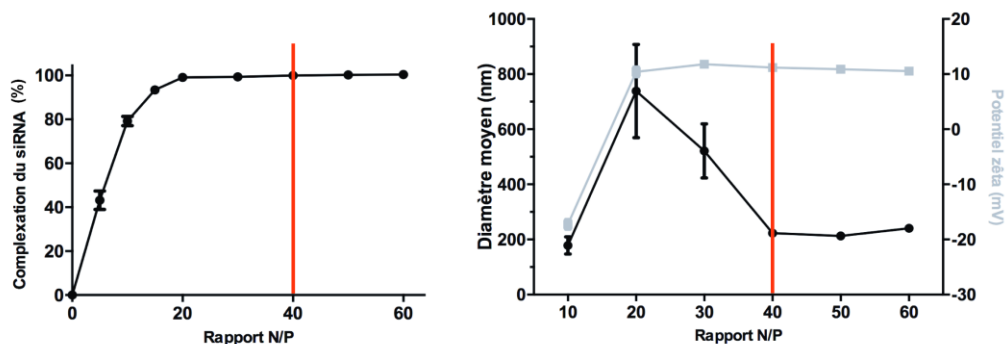


Figure I.1. Exemple de la détermination du rapport N/P optimal en fonction de l'incorporation du siRNA, du diamètre et du potentiel zêta des polyplexes. Dans ce cas-ci, le N/P optimal est de 40.

Lorsqu'un rapport N/P optimal a été déterminé et que les polyplexes présentent des caractéristiques de taille, de charge et de taux d'encapsulation compatibles avec une administration IV, l'efficacité *in vitro* des polyplexes est ensuite évaluée.

La capacité des polyplexes à entrer dans les cellules HeLa (cellules de cancer du col de l'utérus) est tout d'abord étudiée. L'entrée cellulaire peut être évaluée soit par cytométrie en flux, soit par microscopie à fluorescence, grâce à l'utilisation d'un fluorochrome greffé au siRNA.

Après l'étape d'endocytose, la libération de l'endosome est une autre étape cruciale pour l'administration de siRNA. La stratégie utilisée dans le cadre de cette étude pour favoriser cette libération de l'endosome est le mécanisme « d'éponge à protons ». Afin d'évaluer la capacité théorique des polyplexes à s'échapper de l'endosome, le pouvoir tampon des polymères polycarbonates est évalué par titrage acide-base, entre pH 7,4 et pH 5,1. Le PEI, un polymère de référence bien connu pour son pouvoir tampon et son effet « d'éponge à protons », est utilisé comme référence [6, 7].

Finalement, l'efficacité des polyplexes, résultant du relargage du siRNA dans le cytoplasme, et menant à la dégradation de l'ARNm cible, est évaluée par RT-qPCR. Cette efficacité est confirmée par western blot, une technique semi-quantitative permettant d'évaluer le niveau d'expression de la protéine ciblée (HDAC5 ou HDAC7).

Une partie de cette étude a été présentée dans un article intitulé « *Impact of the Structure of Biocompatible Aliphatic Polycarbonates on siRNA Transfection Ability* », publié dans le journal *Biomacromolecules* en 2015 [8] repris au paragraphe **I.2.1**.

I.1. Résumé des résultats	103
I.2. Résultats.....	106
I.2.1. Publication	106
I.2.2. Supporting information	133
I.2.3. Résultats non publiés	136
I.3. Discussion et conclusions.....	138

I.1. RÉSUMÉ DES RÉSULTATS

Les polycarbonates aliphatiques ont été synthétisés par le SMPC de l'Université de Mons. Les détails concernant leur synthèse et leur caractérisation sont développés dans la section « *Materials and methods* » de la publication (**I.2.1.iii**). Au total, 27 polymères ont été testés pour leur capacité à former des polyplexes. Ceux-ci varient en fonction de leur masse moléculaire, de leur structure (linéaire ou ramifiée), de l'addition ou non d'une chaîne de PEG et de la présence de groupements fonctionnels.

Deux groupes fonctionnels principaux ont été choisis pour être greffés au squelette polycarbonate : les fonctions guanidines et morpholines (Figure I.2). Ces fonctions ont pour but d'apporter une charge positive au polymère polycarbonate aliphatique permettant de complexer le siRNA et interagir avec les membranes pour permettre la pénétration cellulaire des polyplexes.

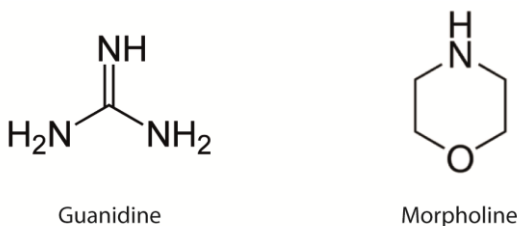


Figure I.2. Groupements fonctionnels guanidine et morpholine

Les premiers polymères testés contenaient soit des fonctions guanidines, soit des fonctions morpholines. Les premières observations indiquent que les polymères contenant uniquement des **fonctions morpholines** ne sont pas capables de complexer le siRNA (polymère **1a** de la publication, et **1** et **2** du tableau page 137 reprenant les polymères ne faisant pas partie de la publication). Ceci s'explique par le fait que ces fonctions ne sont pas totalement ionisées au pH

de préparation des polyplexes (pH 7,5), et n'apportent pas suffisamment de charges positives pour complexer le siRNA.

Les résultats observés pour les polymères fonctionnalisés par des **groupements guanidines** sont différents. La plupart de ces polymères complexent le siRNA en fonction de leur rapport N/P pour arriver à une encapsulation de plus de 90 %, et ce, quelle que soit leur architecture (polymères **2a**, **2b**, **2d**, **2e**, **2f** et **2g** de la publication, et **3** et **4** du tableau page 137). Seul le polymère **2c** n'est pas capable de complexer totalement le siRNA, probablement en raison d'une masse moléculaire plus faible (4500 Da) [9] par rapport à celle des autres polymères (comprise entre 8100 et 44400 Da).

Au rapport N/P optimal, certains des polyplexes formés présentent une taille favorable entre 50 et 300 nm (polymères **2b** et **3**), tandis que les autres montrent une taille plus élevée, jusqu'à 600 nm (comme le **2g**). Il est cependant difficile d'établir un lien entre la structure du polymère et les différences de tailles observées. Pour la charge de surface, la plupart possèdent un potentiel zêta légèrement positif (entre +1 et +8 mV) au N/P optimal, sauf le polymère **3** de masse moléculaire faible (8100 Da) qui forme des polyplexes de charge négative, quel que soit le rapport N/P.

Tous les polyplexes formés à partir de polymères fonctionnalisés par des groupements guanidines sont capables d'entrer dans les cellules HeLa par endocytose, à l'exception du polymère **3**, probablement en raison de sa charge négative. Cependant, aucun de ces polymères ne conduit à une diminution de l'expression de la protéine ciblée. L'explication la plus probable est leur difficulté à être libérés de l'endosome. En effet, le pouvoir tampon des polymères ne contenant que des fonctions guanidines est très faible, en comparaison au polymère contrôle, le PEI (Figure 4 de la publication). Les polyplexes restent probablement confinés dans les endosomes où le siRNA est dégradé avant d'atteindre le cytoplasme.

Afin d'augmenter ce pouvoir tampon, des polymères contenant une **combinaison de groupements morpholines et guanidines** ont été synthétisés (polymères **3a**, **3b** et **5-10**). Le titrage acide-base de ces polymères montre que le pouvoir tampon augmente avec le rapport entre le nombre de fonctions morpholines et le nombre de fonctions guanidines (rapport morpholine/guanidine). En augmentant la proportion de fonctions morpholines jusqu'à un rapport de 1, le pouvoir tampon devient équivalent à celui du PEI (Figure 4 de la publication) [6, 7]. Cependant, malgré l'augmentation du pouvoir tampon à un niveau

équivalent à celui du PEI, les polyplexes **3b** ne montraient toujours pas d'efficacité de dégradation de l'ARNm.

Notre stratégie s'est alors tournée vers la synthèse de **polymères amphiphiles**. En effet, Geihe et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'efficacité des polyplexes en ajoutant un groupement hydrophobe sur la structure de polycarbonates fonctionnalisés par des guanidines [10]. Différents groupements hydrophobes, comme du cholestérol, de l'alcool benzylique, du dodécane-thiol ou un bloc de polycarbonate aliphatique, ont été ajoutés à la structure des polymères fonctionnalisés par une combinaison de fonctions guanidines et morpholines (polymères **3c**, et **11-16**). Parmi ceux-ci, le polymère **3c**, contenant un bloc de polycarbonate aliphatique, a permis d'obtenir des polyplexes d'une taille proche de 150 nm et d'une charge de surface proche de +11 mV à un rapport N/P de 40. Grâce à un rapport morpholine/guanidine supérieur à 1, son pouvoir tampon est légèrement supérieur à celui du PEI. Les autres polymères greffés avec d'autres groupements hydrophobes (**11-16**) forment des polyplexes présentant soit une taille trop élevée, soit un potentiel zêta qui reste négatif malgré l'augmentation du rapport N/P.

La présence d'un bloc de polycarbonate aliphatique sur la structure du polymère **3c** (Figure 8 de la publication) lui confère un caractère amphiphile, pouvant permettre l'interaction des polyplexes avec les membranes cytoplasmiques et endosomales [11, 12]. Pour les autres polymères amphiphiles, la taille négligeable de leur groupement hydrophobe par rapport au reste de la structure moléculaire du polymère ne suffit probablement pas à former des micelles stables.

Le polymère **3c** s'est révélé efficace pour former des polyplexes aux caractéristiques physico-chimiques adéquates, capables de pénétrer dans la cellule, d'être libérés de l'endosome et relarguer le siRNA. L'administration du siRNA provoque la dégradation de l'ARNm HDAC5 ou HDAC7, conduisant à la diminution de l'expression de la protéine correspondante. Cette efficacité est comparable à l'efficacité *in vitro* du polymère témoin, le PEI (Figure 7).

I.2. RÉSULTATS

I.2.1. PUBLICATION

IMPACT OF THE STRUCTURE OF BIOCOMPATIBLE ALIPHATIC POLYCARBONATES ON siRNA TRANSFECTION ABILITY

Antoine Frère¹, Michal Kawalec⁴, Sarah Tempelaar⁴, Paul Peixoto², Elodie Hendrick³, Olivier Peulen², Brigitte Evrard¹, Philippe Dubois⁴, Laetitia Mespouille^{4†}, Denis Mottet^{3†}, Géraldine Piel^{1†}

¹Laboratory of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy – CIRM, University of Liege, Avenue de l'Hopital 1 - 4000 Liege, Belgium

²Metastasis Research Laboratory – GIGA, University of Liege, Avenue de l'Hopital 1 - 4000 Liege, Belgium

³Protein Signalisation and Interaction – GIGA, University of Liege, Avenue de l'Hopital 1 - 4000 Liege, Belgium

⁴Laboratory of Polymeric and Composite Materials, Center of Innovation and Research in Materials and Polymers (CIRMAP), Research Institute for Health Sciences and Technology, University of Mons, Place du Parc 20 - 7000 Mons, Belgium

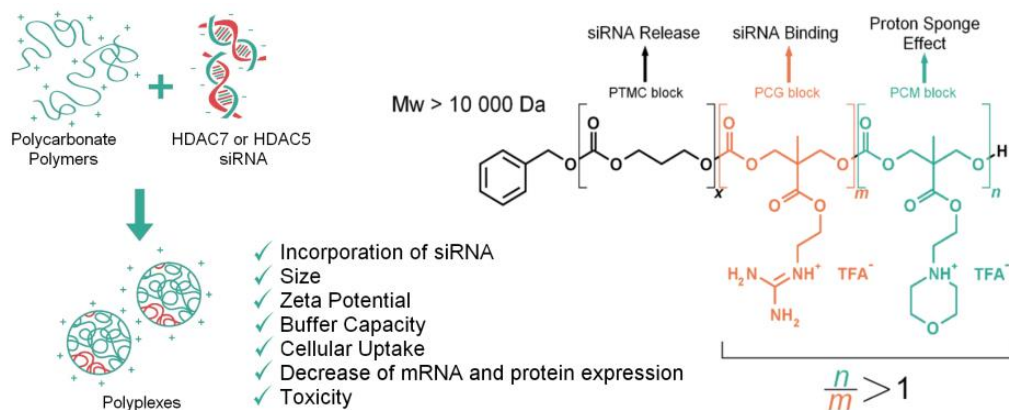
[†]This work was performed equally between three associated laboratories.

Biomacromolecules, 2015, 16, 769-779

DOI: 10.1021/bm501676p

I.2.1.i. Abstract

RNAi therapeutics are promising therapeutic tools that have sparked the interest of many researchers. In an effort to provide a safe alternative to PEI, we have designed a series of new guanidinium and/or morpholino functionalized biocompatible and biodegradable polycarbonate vectors. The impact of different functions (morpholino-, guanidinium-, hydrophobic groups), of the architecture (linear homopolymer to dumbbell-shape) and of the molecular weight of these copolymers on their capacity to form polyplexes and to decrease the expression of two epigenetic regulators of gene expression, HDAC7 and HDAC5 was evaluated. The use of one of these polymers combining morpholine and guanidine functions at the ratio >1 and hydrophobic trimethylene carbonate groups showed a significant decrease of mRNA and protein level in HeLa cells, similar to PEI. These results highlight the potential of polycarbonate vectors for future in vivo application as an anti-cancer therapy.



Keywords: ring-opening polymerization, aliphatic polycarbonates, guanidinium, morpholine, polyplex, HDAC siRNA.

I.2.1.ii. Introduction

Owing to their specific and effective gene silencing, RNA interference (RNAi) has become a vital tool for gene down regulation in molecular medicine for the treatment of a variety of diseases, such as viral infections, cancer and neurodegenerative diseases [13-15].

A RNA interference approach to anti-angiogenic therapy specifically targets the mRNA of histone deacetylases 7 (HDAC7). The shutdown of the HDAC7 protein disturbs the angiogenic process, making HDAC7 an attractive target that would directly interfere with the growth of cancerous tumors and metastasis development [16, 17]. Another possible target in the histone deacetylases family is HDAC5, controlling the cell-cycle progression and survival of human cancer cells [18]. Although the use of siRNA in gene therapy has reached clinical evaluation [19], several problems remain with respect to its in vivo use. Complications include an inability to cross the cytoplasmic membrane, instability in the blood and an inability to specifically target abnormal cells [13]. The use of gene carrier systems able to drive genetic materials towards targeted cells, although challenging, could overcome these issues. Successful gene therapy relies on the development of vectors that can effectively, selectively and safely carry the oligonucleotide sequences to targeted sites [1, 20, 21].

Synthetic polymeric vectors are an excellent alternative to viral vectors with their safe handling and their upscalability as obvious advantages. Additionally, the possibility to modify their structure and composition and the ability to decorate them with suitable ligands allows for specifically targeted therapy, siRNA payload maximization and the preparation of nanoparticles that have a specific pharmacokinetic and biodistribution profile [22, 23]. Usually polycations are employed as vectors as their positive charges can easily interact with the phosphate groups of the oligonucleotide through electrostatic interactions [24] leading to the condensation of oligonucleotides into structures called polyplexes [25].

Although many polymers have been reported to form stable polyplexes, to date none have matched the efficiency of viral vectors. This gap is related to factors such as cytotoxicity, non-biodegradability and (too) strong interaction of polymeric vectors with plasma proteins or oligonucleotides preventing release into the cytoplasm [26-28].

These major limitations remain a great challenge in the design of polycations. To address the cytotoxicity of polycations, biocompatible sequences such as aliphatic polycarbonates [29-31] or

poly(ethylene oxides) (PEO) could be introduced [20, 32] whilst the escape of nanoparticles from endosomes can be facilitated by the introduction of functional groups onto the polymer that can act as “proton pumps” [33].

Due to its ability to favor endosomal escape via the “proton sponge effect”, the most widely used synthetic polymer carrier in this field is polyethylenimine (PEI) [34-36]. However, due to its cytotoxicity its use in vivo is undesirable [37]. Alternatively, weak bases such as morpholine [38] ($pK_a = 8.36$ but lower when grafted to the polymer structure) or histamine [39, 40] (pK_a of the imidazole group = 6.04) may be useful as “proton pumps” in the structure of vectors. Aside from endosomal escape, the successful decoupling of the siRNA from its carrier once in the cytoplasm is similarly challenging.

We aim to develop biodegradable carriers composed of cationic aliphatic polycarbonates. Aliphatic polycarbonates are an interesting class of polymers with particular suitability for green technology and biomedical applications as a result of their high biocompatibility, reliable (bio)degradability, low toxicity and amorphous nature [41, 42]. Wender and co-workers recently reported the design of oligocarbonates for use as vectors. The authors, inspired by the ability of arginine-rich HIV-Tat 9-mer peptide (RKKRRQRRR) [43] to easily enter cells, designed oligomeric aliphatic polycarbonates functionalized with guanidinium side groups that were able to complex, transport and effectively deliver siRNA into cells [10].

Herein we synthesized guanidinium-rich polycarbonate copolymers via metal-free ring-opening polymerization (ROP) [44, 45] and explored the impact of these polymer architectures on their siRNA complexation and cell transfection ability. Furthermore, we investigated to what extent the incorporation of weakly basic morpholino functionalities and hydrophobic groups into the polycarbonate structure favors endosomal escape and enables subsequent silencing of both HDAC7 and HDAC5 proteins.

I.2.1.iii. Materials and methods

a. Materials

Triethylamine (NEt_3) (>99%, Aldrich), 4-(2-hydroxyethyl)morpholine (99%, Aldrich), (+)-sparteine (>99% Aldrich) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) ($\geq 99.0\%$, Fluka) were dried over BaO and distilled under reduced pressure before use. *N*-(3,5-Trifluoromethyl)phenyl-*N'*-cyclohexylthiourea (TU) was prepared as previously reported [46]. Toluene and

tetrahydrofurane (THF) both (p.a., Chemlab) were dried using a MBRAUN solvent purification system under N_2 . Methylene chloride (DCM) (CH_2Cl_2 , HPLC grade, Fisher) was dried over CaH_2 for 48 hours and distilled under reduced pressure. Oxalyl chloride (98%, Alfa Aesar), 1,3-di-boc-2-(2-hydroxyethyl)guanidine (>96%, Fluka), 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 99% VWR), trifluoroacetic acid (TFA, 99% Aldrich), *N,N*-dimethylformamide (DMF) (99.8%, Aldrich), ethyl acetate and heptane (p.a. Chemlab) were used as received. Poly(ethylene oxide)monomethyl ether (PEG2k, $M_n = 2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma) and α,ω -bishydroxyl polyethyleneglycol ($M_n = 2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Aldrich) were dried via three successive azeotropic distillations with H_2O /toluene by the addition of dried toluene. Pa. Dowex [H+] resin (Dowex 50 WX2 400, Aldrich) was washed thoroughly with MeOH prior use.

The HDAC7 siRNA sequence is the following: 5'-CGA-CAA-GAG-CAA-GCG-AAG-UUU-3' (sense strand), 5'-ACU-UCG-CUU-GCU-CUU-GUC-CUU-3' (antisense strand). The fluorescent labeled Alexa Fluor[®] 546 HDAC7 siRNA corresponds to the same sequence. The HDAC5 siRNA sequence is: 5'CAG-CAU-GAC-CAC-CUG-ACA-AUU-3' (sense strand), 5'-UUG-UCA-GGU-GGU-CAU-GCU-GUU-3' (antisense strand). The irrelevant siRNA sequence is: 5'-AGA-GUU-CAA-AAG-CCC-UUC-UU-3' (sense strand), 5'-GAA-GGG-CUU-UUG-AAC-UCU-UU-3' (antisense strand). These siRNAs and agarose (molecular biology grade) were provided by Eurogentec (Seraing, Belgium). Branched PEI (25 kDa) and ethidium bromide solution (BET) were purchased from Sigma-Aldrich (Diegem, Belgium). Nuclease-Free Water was obtained from Ambion (Life Technologies, Gent, Belgium). 20X TE (Tris-EDTA, pH 7.5) buffer was purchased from Invitrogen (Life Technologies, Gent, Belgium). Glycerol and mannitol were purchased from Certa (Braine-l'Alleud, Belgium). Electran (TAE buffer, 50X pH 8.0) was obtained from VWR (Leuven, Belgium). Low molecular weight DNA ladder and gel blue loading (6X) were provided by New England Biolabs (Ipswich, UK). Mouse monoclonal antibodies against HDAC7 and HSC70 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit monoclonal antibody against HDAC5 was obtained from Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

b. Polymer characterization

^1H NMR spectra were recorded by using a Bruker AMX-300 or AMX-500 apparatus at room temperature in $CDCl_3$ or in $DMSO-d_6$ (30 mg per 0.6 mL). Size exclusion chromatography (SEC) was performed in $CHCl_3$ at 30°C or in THF + 2 w% NEt_3 at 35°C, using an Agilent 1200 chromatograph equipped with a degasser, an isocratic HPLC pump (flow rate = $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), an auto-sampler (loop volume = 200 mL, solution concentration = $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), refractive-index and UV-Vis detectors, and three columns: a PL gel 10 mm guard column and two PL gel Mixed-B 10

mm columns (linear columns for separation of MW PS ranging from 500 to 106 Dalton). Poly(styrene) standards were used for calibration. MALDI mass spectra were recorded using a Waters QToF Premier mass spectrometer equipped with a nitrogen laser, operating at 337 nm with a maximum output of 500 J.m^{-2} delivered to the sample in 4 ns pulses at 20 Hz repeating rate. Time-of-flight mass analyses were performed in the reflection mode at a resolution of about 10000. The matrix, trans-2-[3-(4-tert-butyl-phenyl)-2-methyl-2-propenylidene]-malononitrile (DCTB), was prepared in chloroform with a concentration of 20 mg.mL^{-1} . The matrix solutions (1 mL) were applied to a stainless steel target and air dried. Polymer samples were dissolved in acetonitrile to obtain 1 mg.mL^{-1} solutions. 1 mL aliquots of these solutions were applied onto the target area already charged with the matrix crystals, and then dried. Finally, 1 mL of a NaCl solution (2 mg.mL^{-1} in acetonitrile/water, 1/1 v/v) was applied on the target plate. For recording the single-stage MALDI-MS spectrum, the quadrupole (rf-only mode) was set to pass ions from 3500 to 6500 Th, and all ions were transmitted to the pusher of the time-of-flight analyser where they were mass analyzed with 1s integration time. Data were acquired in the continuum mode until acceptable averaged data were obtained.

c. Macroinitiator syntheses

Synthesis of α,ω -2,2-Bis(hydroxymethyl) propanoate poly(ethylene oxide) (PEO(OH)₂) (PEO-Bis-(OH)₄)

In a dry flask, under nitrogen flow were introduced 766 mg isopropylidene-2,2-bis(methoxy)propionic acid (8.8 mmol, 8.8 eq.) and 25 mL anhydrous methylene chloride. The solution was cooled to 0°C before a solution of DCC (495 mg, 2.4 mmol, 2.4 eq.) in methylene chloride (10 mL) was added dropwise. A white precipitate resulting from the formation of urea appeared within a few minutes. The mixture was stirred vigorously for 2 hours at room temperature after which a solution of dry PEO-(OH)₂ (2.00 g, 1.0 mmol, 1 eq.) and 4-dimethylaminopyridine (12.2 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.) in methylene chloride was added. Full derivatization of the PEO-(OH)₂ was achieved after 18 days as confirmed by MALDI ToF analysis. The urea was filtered off and the functionalized PEO was recovered by precipitation in cold diethyl ether. Then 1.5 g of the polymer sample was dissolved in 10 mL MeOH, Dowex [H+] (Dowex 50 WX2 400) was added and the mixture was allowed to stir at r.t. for 4h. Finally, the deprotected polymer was recovered after two precipitations in cold diethyl ether. Yield = 45 %.

Synthesis of the α -methoxy, ω -2,2-Bis(hydroxymethyl) propanoatepoly(ethylene oxide) macroinitiator (PEO-Bis-(OH)₂)

The synthesis of PEO-Bis-(OH)₂ for use in the synthesis of 3-arm block copolymers was achieved using the method described for the synthesis of PEO-Bis-(OH)₄ using poly(ethylene oxide) monomethyl ether ($M_n = 2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Synthesis of α,ω -D-galactopyranosyl poly(ethylene oxide) ((OH)₄-Gal-PEO-Gal-(OH)₄)

The oxidation of PEO-(OH)₂ into COOH-PEO-COOH was inspired by Anelli's oxidation as previously reported [47, 48]. A solution of PEO-(OH)₂ (10 g, 0.05 mol, 1 eq.), NaBr (1.54 g, 0.015 mol, 0.3 eq.) and TEMPO (1.56 g, 0.01 mol, 0.2 eq.) in 200 mL distilled water was prepared. The pH of the solution was adjusted to 12 by the addition of 1M NaOH and a 6% aqueous solution of NaClO (60 mL). After stirring for 72 hours at room temperature, the reaction was quenched by the addition of MeOH (10 mL) and the pH of the mixtures was adjusted to 1 by addition of HCl (5M_{aq}). The product was extracted from the aqueous solution with 5x 100 mL DCM. The organic phases were combined, dried over MgSO₄, and concentrated. The α,ω -biscarboxylic acid poly(ethylene oxide) (PEO-(COOH)₂) was recovered by selective precipitation in cold diethyl ether, filtered and dried under vacuum (Yield: 33.7 %). Full conversion was attested by MALDI-ToF analysis.

Next, a solution of PEO-(COOH)₂ (1 g, 0.5 mmol, 1 eq.) and 1,2,3,4-di-O-isopropylidene-D-galactopyranose (1.0411 g, 4 mmol, 8 eq.) in anhydrous CHCl₃ (20 mL) was prepared which was maintained at 0°C. A mixture of DCC (0.227 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.) and DMAP (0.0122 g, 0.1 mmol, 0.2 eq.) dissolved in CHCl₃ was added and the reaction was allowed to proceed at room temperature for 24 hours after stirring for 5 minutes at 0°C. The urea salt was filtered off and the polymer was recovered by selective precipitation in cold diethyl ether. MALDI-ToF analysis was performed to attest for the successful esterification. Then, the recovered polymer was dissolved in a mixture of CF₃COOH (9 mL) and H₂O (1 mL) for deprotection. MS-analysis performed after 30 minutes revealed near quantitative deprotection.

d. Copolymer syntheses***Typical procedure for the organocatalytic ROP of CM and boc-CG in the synthesis of (protected) copolymers***

A glass vial in a glove box, equipped with a magnetic stirrer, was charged with (macro)initiator, catalyst (DBU or (+)-sparteine) and methylene chloride or CDCl_3 . Once homogeneous, a solution composed of monomer, TU cocatalyst and methylene chloride or CDCl_3 were added to give a final monomer concentration of 1 M. The vial was sealed and maintained under vigorous stirring until >90% monomer conversion was reached as observed by SEC or ^1H NMR. In case of polymers **PEO-b-PCM₅₈** (**1a**), **PEO-b-PCG₉₅** (**2a**), **PCG₅₉-b-PEO-b-PCG₅₉** (**2b**), **PEO-b-PCG₈** (**2c**), **PEO-b-(PCG₃₉)₂** (**2d**), **Bz-PCG₈₀** (**2e**), **(PCG_{12.5})₂-b-PEO-b-(PCG_{12.5})₂** (**2f**) and **(PCG₁₀)₄-b-PEO-b-(PCG₁₀)₄** (**2f**) and reactions were quenched with HCl diluted in diethyl ether. The solutions were precipitated in diethyl ether or hexane and the resulting copolymers were dried overnight under reduced pressure. In case of triblock copolymers **PEO-b-PCM₁₄-b-PCG₅₅** (**3a**) and **PEO-b-P(CG₅₄-b-CM₅₅)** (**3b**) the second monomer was added and the polymerization was continued until >90% monomer conversion was reached as observed by SEC after which its work-up was carried out. In case of triblock copolymer **Bz-PTMC₃₂-b-PCG₉-b-PCM₁₂** (**3c**), the first monomer was TMC. Subsequent additions of boc-CG and CM were each carried out after >90% conversion of the previous monomer was reached by ^1H NMR. Ratios of catalyst to initiator used were either 1:2:2 (OH/DBU/TU) or 1:5:10 (OH/(+)-sparteine/TU). The polymer samples were characterized by SEC in THF + 2w% NEt_3 and ^1H NMR in CDCl_3 to determine the macromolecular parameters.

Deprotection and conversion of pendent functionalities into the chloride or TFA salt

In a typical experiment, the deprotection of the Boc groups protecting the guanidinium moieties was conducted in a 20 mL stirred solution of CH_2Cl_2 /TFA 9:1 v/v for 18 hours at room temperature. Volatiles were removed *in vacuo* and the deprotected polymer was recovered by selective precipitation in diethyl ether. The morpholino moieties of **1a** were converted into the chloride salt by dissolving 70 mg of the polymer sample in 2 mL of THF followed by an acidification of the medium to pH = 4 using 1M HCl. The milky solution was dialyzed (MWCO = 3.4 kDa) against distilled water for 72 hours after which the polymer was recovered by freeze-drying.

Products were characterized by ^1H NMR in DMSO-d^6 .

e. Polyplex formation

Polyplexes were prepared by electrostatic interaction of the cationic copolymers with the negatively charged siRNA according to the N/P ratio. N/P corresponds to the ratio of the moles

of the protonable amino groups (N) on the polymer to the moles of the phosphate groups (P) on siRNA. In practice, the N value corresponds to the concentration of guanidinium + morpholino functionalities (in nmol) per μg of polymer. Polymers were dissolved in TE buffer (pH 7.5, isotonized by mannitol) at a concentration of 1 mg.mL^{-1} . siRNA was dissolved in the same buffer at a concentration of $1 \mu\text{M}$. Complexes were obtained by addition of the siRNA solution to the cationic polymer solution, followed by the dilution to the desired concentration of siRNA. The mixture was immediately vortexed for 10 seconds and left for 30 minutes at room temperature for polyplexes formation.

f. siRNA incorporation efficiency

Gel retardation assay

The binding capacity of siRNA with polycarbonate polymers was assessed by gel retardation assay. Polymer/siRNA complexes were prepared at different N/P ratios as described above to obtain a final siRNA concentration of 300 nM. $2 \mu\text{L}$ of glycerol, $1 \mu\text{L}$ of 6X gel blue loading were added to $30 \mu\text{L}$ of polyplexes. The samples were loaded onto a 4% agarose gel in TAE buffer with 0.01% ethidium bromide. Electrophoresis was performed at 100 V for 1 hour in a Horizon 11.14 horizontal gel electrophoresis apparatus (Biometra, Goettingen, Germany). The gel was visualized by exposure to UV-illumination by a Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, USA).

Quant-iT™ RiboGreen® RNA reagent assay

The ability of the polymers to complex siRNA was also determined by the Quant-iT™ RiboGreen® RNA reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Life Technologies, Gent, Belgium). Particles were formed at various N/P ratios as described above. $100 \mu\text{L}$ of each sample was transferred into a 96-well plate. The plate was mixed at 500 rpm for 5 minutes and then $100 \mu\text{L}$ of a dilute solution of RiboGreen® reagent (1:200 in TE buffer) was added to each sample. The fluorescence was measured after 5–10 minutes of incubation using a spectra MAX Gemini® microplate fluorescence reader (Molecular Devices) with the SoftMax PRO software. The wavelengths of excitation and emission were 485 and 530 nm respectively. The detected fluorescence corresponds to the free siRNA present in the solution. Two calibration curves with ranges from 1 ng.mL^{-1} to 50 ng.mL^{-1} and from 20 ng.mL^{-1} to $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ were prepared in the same buffer.

g. Polyplex size and ζ potential measurements

Polyplex dispersions (100 nM of siRNA) were sized by Photon Correlation Spectroscopy (PCS) using a High Performance Particles Sizer (HPPS, Malvern Instruments, UK). Measurements were made at 25°C with a fixed angle of 90° and the results were expressed as the average polyplex hydrodynamic diameter (nm). The viscosity and refractive index of pure water were used. The system was calibrated with an aqueous latex dispersion of particles with a 200 nm diameter. Results are Z-average diameter and polydispersity index (PDI).

The surface charges of the particles were determined using a Zetasizer® 2000 (Malvern Instruments, UK). The instrument was calibrated with a polystyrene dispersion with known ζ potential. All samples were measured in triplicate (n=3) in TE buffer.

h. Buffer capacity of copolymers

The buffer capacity of the copolymers was determined by acid–base titration. In short, 3 mL of polymer in a 0.1 M NaCl solution with a 6 μ mol total of amine groups was adjusted to pH 8.0 with 0.1 M sodium hydroxide (NaOH), then the solution was titrated with 5 μ L aliquot of 0.1 M hydrochloric acid (HCl), and the pH value was measured after each addition. The buffer capacity is directly related to the volume of 0.1 M HCl needed to decrease the pH from 7.4 to 5.1. The volumes obtained for polycarbonates were compared to PEI.

i. Cell culture

HeLa, a human cervical carcinoma cell line, was obtained from Pr. Marc Thiry (GIGA-Neurosciences, University of Liege, Belgium). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen, Gent, Belgium) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS).

j. Cellular uptake

Flow cytometry

The amount of fluorescent labeled Alexa Fluor® 546 siRNA uptake by cells was measured by flow cytometry. HeLa cells were plated in a 6-well tissue culture plates at 2.5×10^5 cells/well 16 hours prior transfection. Cells were washed twice with D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Invitrogen, Gent, Belgium) and polyplexes were added to cells in Opti-MEM® reduced

serum medium (Invitrogen, Gent, Belgium) at a final concentration of 100 nM Alexa Fluor[®] 546 labeled siRNA. After 3 hours of incubation, cells were washed with D-PBS, trypsinized and collected into complete DMEM medium. Samples were centrifugated 4 minutes at 250 g at room temperature and resuspended in 350 μ L D-PBS. 10^4 cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, FACSCalibur, USA). Data were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences, USA).

Fluorescence microscopy

Incorporated fluorescently labeled Alexa Fluor[®] 546 siRNA were also microscopically assessed using an EVOS FL digital inverted fluorescence microscope (AMG, Life technologies, Gent, Belgium). After 3 hours of incubation, cells were washed twice with D-PBS and then observed under microscope. HeLa cells were observed under visible and red light for fluorescence and both images were combined. Control samples treated with free medium or with polymer alone were also observed under microscope to exclude autofluorescence.

k. Cell viability WST-1 assay

The cytotoxicity of the polyplexes was determined using a water soluble tetrazolium salt assay according to manufacturers' instructions. Briefly, HeLa cells were seeded in a 96-well plates at a density of 104 cells/well, in 100 μ L of DMEM supplemented with 10% FBS and incubated for 24 hours. The different polymers at a concentration of 15 μ g/mL (this polymer concentration corresponds to the one used in the polyplexes) were added to the cells in 100 μ L of Opti-MEM[®] and incubated for 3 hours. Control cells and blank wells (without cells) were treated in the same way but without polymer. Then, cells were washed twice with D-PBS before addition of fresh DMEM + 10% FBS. After 24 hours, 10 μ L of water-soluble cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Basel, Switzerland) was added in each well and plates were incubated for 2 hours at 37°C. Absorbance at 450 and 690 nm was measured with a LabSystem Multiskan MS microplate reader (Thermo LabSystems, Milford, USA). Mean blank value was deduced from all absorbance values. Cytotoxicity was expressed as the mean percentage of cell viability relative to cells without polymer treatment (used as the control group). Each condition was realized in triplicate, and the experiment was repeated four times (n=4). Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA, followed by the Dunnett's test. A p -value < 0.05 was considered significant.

I. Polyplex transfection efficacy

HeLa cells were plated in a 6-well tissue culture plates at 2.5×10^5 cells/well 16 hours prior transfection. Cells were washed twice with D-PBS and polyplexes were added to cells in Opti-MEM[®] reduced serum medium (Invitrogen, Gent, Belgium) at a final concentration of 100 nM siRNA. After 3 hours of incubation, cells were washed with D-PBS and the medium was replaced by DMEM supplemented with 10% FBS and cells were incubated at 37°C for additional time.

Quantitative real-time RT-PCR

After 48 hours of incubation, total RNA was isolated using NucleoSpin[®] RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription was performed with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit[®] (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR was realized on a LightCycler[®] 480 (Roche, Mannheim, Germany) with β -actine as control. Experiments were performed in triplicate and the average CT values were normalized against a control to obtain Δ CT. Relative HDAC7 or HDAC5 mRNA expression compared to irrelevant conditions was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta$ CT method [49]. Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA, followed by a Turkey's test compared to control values of 100 %. A p -value < 0.05 was considered significant. Primers sequences are available on demand.

Western Blot analysis

At the end of the incubation time, HeLa cells were lysed into a SDS buffer (SDS 1%, Tris-HCl 40 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM and proteases inhibitors mixture). Equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE. Membranes were probed with primary antibodies against HDAC7, HDAC5 or E2F1, followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, and developed by chemiluminescence detection. Detection of HSC70 protein was used as a loading control.

I.2.1.iv. Results and discussion

a. Polymer synthesis

As demonstrated in literature, the nature of polymers has a tremendous impact on their properties as a vector. The polymer architecture, polycation length, 'proton sponge' content and hydrophilic-lipophilic balance all influence the binding ability and transfection efficiency of a vector [10, 39, 50, 51]. To that end, biodegradable polycationic vectors with different architectures and varying polycation and 'proton sponge' block lengths were designed. Linear

di- and tri-block copolymers as well as H-, Y- and dumbbell-shaped architectures were prepared from PEO macroinitiators or a benzyl alcohol initiator. The choice of monomers was based on the natural self-assembling ability of guanidines with acids and the buffering ability of morpholines [52].

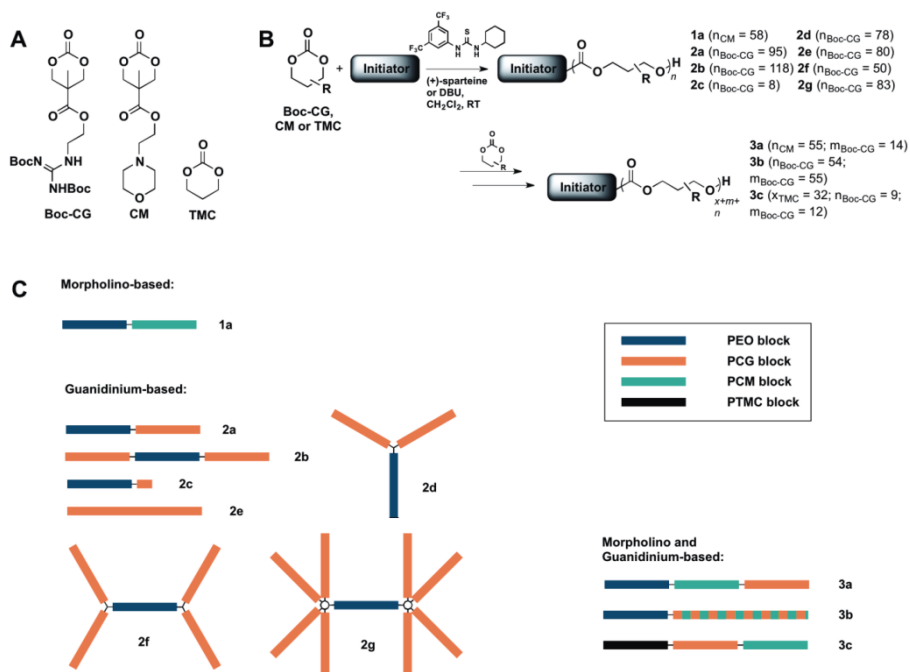


Fig. 1. **(A)** Structure of monomers Boc-CG, CM and TMC. **(B)** General scheme showing the organocatalytic ROP of the cyclic monomers (Boc-CG, CM and TMC) in the synthesis of the polycarbonates before Boc deprotection. The initial monomer was different in each synthesis. CM for **1a**, Boc-CG for **2a-g**, CM+Boc-CG for **3b** and in case of **3a** and **3c** monomers were added sequentially (CM then Boc-CG and TMC, Boc-CG then CM respectively). **(C)** Schematic representation of the various morpholino-, guanidinium and morpholino-/guanidinium- functional polycarbonates.

The synthesis of these novel vectors was realized via the organocatalytic ring-opening polymerization (ROP) [53-57] of cyclic carbonate monomers carrying a boc-protected guanidinium (CG) or morpholino, functionality (CM) [10, 58]. A range of polymer and block lengths was targeted with overall lengths of the block(s) between 8 and 118 polycarbonate polymer units. Structures and characteristics of these polymers are presented in **Figure 1** and **Table 1**. Morpholino-only functional polycarbonate **1a** was prepared by the ROP of CM from a PEO macroinitiator and is the only vector without guanidinium functionalities. In the case of

guanidinium-functional poly(carbonate)s **2a-g** a range of architectures were prepared: from linear homopolymer (**2e**) to dumbbell-shape (**2g**). Polymers **3a** and **3c** were prepared via *in situ* chain-extension in the formation of new triblock copolymers with both a PCM and a PCG block. A hydrophobic block could be easily introduced in the case of **3c** with the use of a third monomer (trimethylene carbonate). Furthermore, the nature of the middle block could be easily controlled through sequential addition of the monomers. Deprotection of the guanidine groups using trifluoroacetic acid was performed for polymers **2a-g** and **3a-c** while **1c** was treated with HCl to obtain the morpholino salt.

An example of typical ^1H NMR spectrum of cationic polymer before deprotection is available in the supporting information (**Figure S1**).

Table 1. Guanidinium-based and/or morpholino-based aliphatic polycarbonates obtained by organocatalytic ROP of functional cyclic carbonates (DCM, r.t., $[M]_0 = 1M$).

No.	Samples	Initiator	DP ^a		M_n^b (g.mol ⁻¹)	\bar{D}^c	N_g^d (nmol.μg ⁻¹)	N_m^d (nmol.μg ⁻¹)	N_{nd}^d N_g
			DP CG	DP CM					
Morpholino-based only									
1a	PEO- <i>b</i> -PCM ₅₈	PEO _{2k} -OH	-	58	20600	1.5	0	2.93	/
Guanidinium based only									
2a	PEO- <i>b</i> -PCG ₉₅	PEO _{2k} -OH	95	-	36500	1.5	2.63	0	0
2b	PCG ₅₉ - <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PCG ₅₉	HO-PEO _{2k} -OH	118	-	44400	1.6	2.66	0	0
2c	PEO- <i>b</i> -PCG ₈	PEO _{2k} -OH	8	-	4500	1.4	1.56	0	0
2d	PEO- <i>b</i> -(PCG ₃₉) ₂	PEO-Bis-(OH) ₂	78	-	30100	1.3	2.59	0	0
2e	Bz-PCG ₈₀	Bz-OH	80	-	28700	1.8	2.78	0	0
2f	(PCG _{12.5}) ₂ - <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -(PCG _{12.5}) ₂	PEO-Bis-(OH) ₄	50	-	20300	n/d	2.47	0	0
2g	(PCG ₁₀) ₄ - <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -(PCG ₁₀) ₄	(OH) ₄ -Gal-PEO-Gal-(OH) ₄	83	-	27200	1.5	2.5	0	0
Morpholine and guanidinium based copolymers									
3a	PEO- <i>b</i> -PCM ₁₄ - <i>b</i> -PCG ₅₅	PEO _{2k} -OH	55	14	26800	1.6	2.04	0.5	0.26
3b	PEO- <i>b</i> -P(CG ₅₄ - <i>co</i> -CM ₅₅)	PEO _{2k} -OH	54	55	41500	1.3	1.33	1.23	0.92
3c	Bz-PTMC ₃₂ - <i>b</i> -PCG ₉ - <i>b</i> -PCM ₁₂	PTMC ₃₂ -OH	9	12	11300	1.6	0.8	1.1	1.38

^aAs obtained by ¹H NMR spectroscopy (500 MHz) in CDCl₃ at r.t. ^bAs calculated by ¹H NMR spectroscopy (500 MHz) after BOC deprotection. ^cAs obtained by SEC in THF + NEt₃ (2 w%) at 35°C before BOC deprotection. ^dConcentration of nitrogen atoms present in the polymer structure (N value), given by guanidinium functions (N_g) or morpholine functions (N_m)

b. Complexation of siRNA

Initially, the capacity of the different polymers to condense and spontaneously form complexes with oligonucleotide by charge interaction was investigated. Polyplex formation was achieved by the addition of an increasing concentration of polymer to a constant siRNA concentration (300 nM), corresponding to increasing N/P ratios. The uncomplexed fraction of siRNA was evaluated by agarose gel electrophoresis. N/P 0 corresponds to the free siRNA able to freely migrate to the positive electrode. Polycarbonate polymers were compared to PEI which is known to form polyplexes with siRNA.

Figure 2A demonstrates that the siRNA movement was retarded when the PEI concentration (or N/P) was increased, indicating that the siRNA was bound to the polymer and was no longer able to migrate to the positive electrode. Complete encapsulation of siRNA by PEI was observed from N/P 5. Morpholine functional polycarbonate **1a** and polycarbonate incorporating a hydrophobic block (**3c**) did not completely incorporate siRNA (**Figure 2A**). Guanidine functional polymer of low molecular weight (**2c**) only showed a partial incorporation of siRNA even at increased N/P ratios (N/P ~20). Polymers with a higher molecular weight ($>10\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), however, reached complete incorporation of the siRNA into polyplexes from N/P 2.5-7.5, independent of the architecture of the polymer. A small difference in binding was observed for polymer **2a**. The complete incorporation required a higher amount of polymer equal to a N/P ratio 10. Polymers with both guanidine and morpholine functionalities (**3a** and **3b**) were also able to incorporate siRNA, but in case of **3b** incorporation appears to be partial.

In order to validate that the siRNA had indeed been encapsulated by the polymers, the accessibility of siRNA to the RiboGreen[®] fluorescent probe was determined. As shown in **Figure 2B**, at low N/P ratios siRNA was still accessible for RiboGreen[®] in case of polymer **2d** while at a high N/P ratios (excess of polymer) RiboGreen[®] access to siRNA in the particles was impaired. This result indicates that at these N/P ratios, the oligonucleotide was indeed bound to the polymer.

Complexation of siRNA to polymer **2d** increases as a function of the N/P ratio. In accordance to its gel retardation assay result (**Figure 2A**), this quantitative method demonstrates that the incorporation rate reached over 90% from a N/P ratio of 7.5 and near 100% from a N/P ratio of 10. Notably, results observed with the RiboGreen[®] for **3c** were somewhat different from those obtained with the gel retardation assay. The quantitative method revealed that incorporation

above 80% was reached from a N/P ratio of 20. This difference could be explained by a lower affinity between the polymer and the siRNA due to the presence of the hydrophobic chain, destabilizing the particle upon application of an electric field. Results obtained with other polymers confirmed the gel retardation assay observations (**Figure S2**, available in the supporting information).

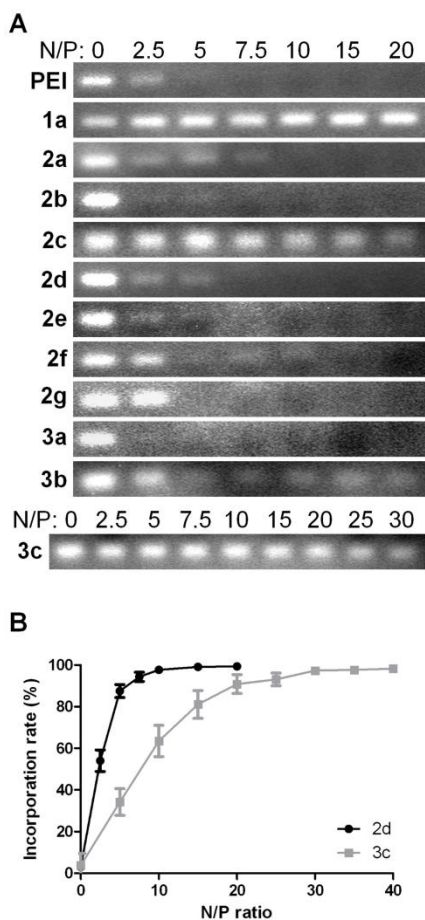


Fig. 2. **(A)** Agarose gel electrophoresis of siRNA (300 nM) in the presence of different copolymers as a function of N/P value (0 to 20, and 0 to 30 for **3c**). **(B)** Incorporation rate of **2d** and **3c** polyplexes according to the N/P ratio was determined by the Quant-iT™ RiboGreen® RNA reagent (mean \pm SEM, n=3).

According to the charge of these new biodegradable polycarbonates, guanidine-only and morpholine/guanidine polymers with an average molecular weight above 10 000 g.mol⁻¹ have a high capacity to form polyplexes. On the other hand, polymers consisting of morpholine functions only showed a very low incorporation of siRNA.

c. Size and ζ potential measurements

A prerequisite for the use of polyplexes as gene therapy vectors is the formation of nanoparticles with a suitable size and charge (represented by the ζ potential). Nanoparticles ranging from 50 nm to a several hundred nanometers are typically taken up by cells [59, 60]. For intravenous use of polyplexes, the average diameter should be around 150-300 nm; not too small to avoid renal excretion and not too large to escape the mononuclear phagocyte system within the blood circulation [1]. This scale also allows accumulation of nanoparticles into the tumor due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect [2, 61]. Moreover, to be able to interact with negatively charged cell membrane constituents such as phospholipids, fatty acids, proteins, and proteoglycans [3, 62], nanoparticles must have a slightly positive charge (ζ potential) of 5-10 mV, but not higher to avoid toxicity.

As the size of siRNA/polymers complexes is a tunable function of the N/P ratio, polymers were tested at different concentration to determine the optimal N/P that provided nanoparticles with physicochemical characteristics compatible with an *in vivo* transfection. As shown in **Figure 3A**, the size of polyplexes formed with **2b** polymer gradually decreased with the increasing N/P ratio and levels in the range of 250 nm from N/P >15. This observation indicates that at very low polymer/oligonucleotide ratios, larger particles are detected. At higher ratios, smaller particles were formed with narrow distributions (PDI < 0.3, data not shown), demonstrating that the polymer indeed condensed siRNA. A similar profile was observed for polymer **3c** (**Figure S3**).

Figure 3A also shows that, as expected, the ζ potential increases as a function of the polymer/oligonucleotide ratio. At a N/P ratio of 5, the ζ potential is near zero while at higher ratios the ζ potential reached a plateau at + 7-8 mV. Increasing the N/P ratio increases the ζ potential to a more positive value, due to the adsorption of cationic polymers into the polyplex. The plateau was reached when an excess of polymer was added to the saturated polyplex. Similar profiles and ζ potential were obtained with the other polymers (**Figure S3**).

Based on the incorporation, the size and ζ potential of each polymer, an optimal N/P ratio of 15 was selected, except for polymers **2a** (N/P 20) and **3c** (N/P 40).

Figure 3B shows the average diameter and polydispersity index (PDI) and **Figure 3C** the ζ potential values of polyplexes at the optimal N/P ratio. The diameter of PEI polyplexes measured by dynamic light scattering was around 600 nm, while polycarbonate polyplexes have

a diameter size between 150 and 600 nm. Different polycarbonate polyplexes possess a size range between 150 and 300 nm that might allow cellular uptake of nanoparticles and their accumulation into the tumors *via* their fenestrated epithelium (EPR effect) [2, 61]. PDI values, showing the size distribution of the sample, were below 0.3 for the polyplexes, suggesting a relatively uniform size. **Figure 3C** also shows a slightly positive ζ potential for polyplexes, varying from +0.8 mV for **2g** (N/P 20) to +11.6 mV for **3c** (N/P 40). These values are in the optimal range for polyplex internalization and interaction with negatively-charged cell membranes in cellular experiments.

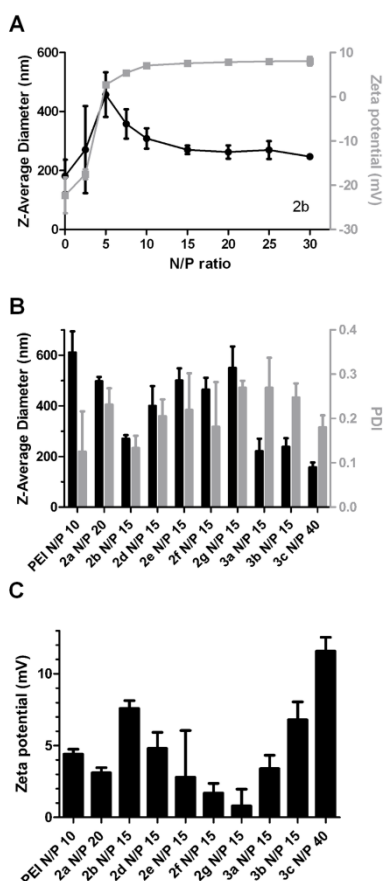


Fig. 3. **(A)** Z-average diameter and ζ potential of **2b** polyplexes as a function of the N/P ratio. **(B)** Z-average diameter and polydispersity index and **(C)** ζ potential values (mV) of polyplex samples at their optimal N/P ratio. (Mean \pm SEM, n=3)

d. Buffer capacity

The ability of polymers to buffer the endosome acidification (from pH 7.4 to pH 5.1) can promote the release of polyplexes into the cytoplasm and avoid siRNA degradation. This phenomenon is called the "proton sponge effect" [27, 60, 63]. The buffering capacity of polycarbonate polymers was evaluated by an acid-base titration from pH 7.4 to pH 5.1 in comparison to PEI which is known to escape the endosome *via* the "proton sponge effect" [64]. The HCl volume needed to decrease the pH from 7.4 to 5.1 was directly related to the buffer capacity of the polymers. The titration curves (**Figure 4**) showed that the presence of morpholine groups increases the buffering capacity of polycarbonate polymers. The buffer capacity is directly related to the morpholine/guanidine ratio (N_m/N_g , **Table 1**). For PEI, 15 μL of 0.1 M HCl was required to decrease the pH value from 7.4 to 5.1. A volume of 5 μL was needed for **2e** (no morpholine group, N_m/N_g ratio of 0) while, due to the presence of morpholine groups, 10 μL are necessary for **3a** (ratio of 0.26). The buffering capacity of polymer **3b** (N_m/N_g ratio of 0.92), is slightly higher than that of PEI (20 μL). Polymers **3c** (ratio of 1.92) and **1a** (100% of morpholine groups) needed volumes of 25 μL and 40 μL , respectively. These values reveal that the buffer capacity of the polymers directly increases with morpholino content and reaches that of PEI, well known for its buffer capacity, when the N_m/N_g ratio is close to 1.

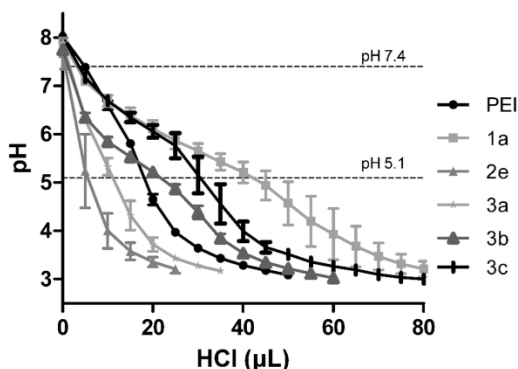


Fig. 4. Titration curves obtained for PEI and polymers 1a, 2e, 3b, 3c and 3e. (Mean \pm SEM, n=3)

e. Cellular uptake

Flow cytometry analysis was performed to assess the transfection efficacy of polycarbonate polyplexes. Those were tested at their determined optimal N/P ratio. **Figure 5A** shows that 95% of HeLa cells had been transfected with PEI control polyplexes. Except for polymers **2a**,

3b (Figure 5B) and **3c** which showed the highest transfection rate (approximately 95% of transfected cells), most of the tested polyplexes (**2b**, **2d**, **2e** and **2f**) showed a transfection efficacy ranging from 75% to 90%. Polyplexes **2g** and **3a** were less efficient with observed transfection rates of 51% and 63%, respectively.

Additionally, flow cytometry allows the analysis of the Mean Fluorescence Intensity (MFI), which represents the relative amount of siRNA present in one cell. In most cases MFI values were lower than the one obtained with PEI (MFI = 4.36). However **2a** and **3c** polyplexes showed a MFI of 8.56 and 15.91, respectively. These results seem to indicate that these two polyplexes are better able to transfect siRNA into HeLa cells than PEI. However, caution should be exercised when analyzing cellular uptake due to the absence of experiment repetition for several polyplexes. Experiments conducted with polymer or fluorescently labelled siRNA alone showed no positive cells, confirming that polymers have no autofluorescence and that siRNA alone is not able to enter the cell.

It can be deduced though that not only the ζ potential but also the architecture of the polymer has an important role in the endocytic mechanism. The presence of guanidine groups, for example, has an important effect as these functional groups allow the formation of hydrogen bonds with carboxylate-, phosphate-, and sulfate-containing constituents of the plasma membrane [62].

Results obtained by flow cytometry were confirmed by fluorescent microscopy (**Figure 5C**) for which cells had been treated with fluorescently labeled **3b** polyplexes. The red fluorescence emitted by Alexa Fluor[®] 546 siRNA was localized in a major population of treated HeLa cells while no autofluorescence was observed in the control samples. In addition, the siRNA appears to be localized in the cytoplasm in close proximity to the nuclear membrane.

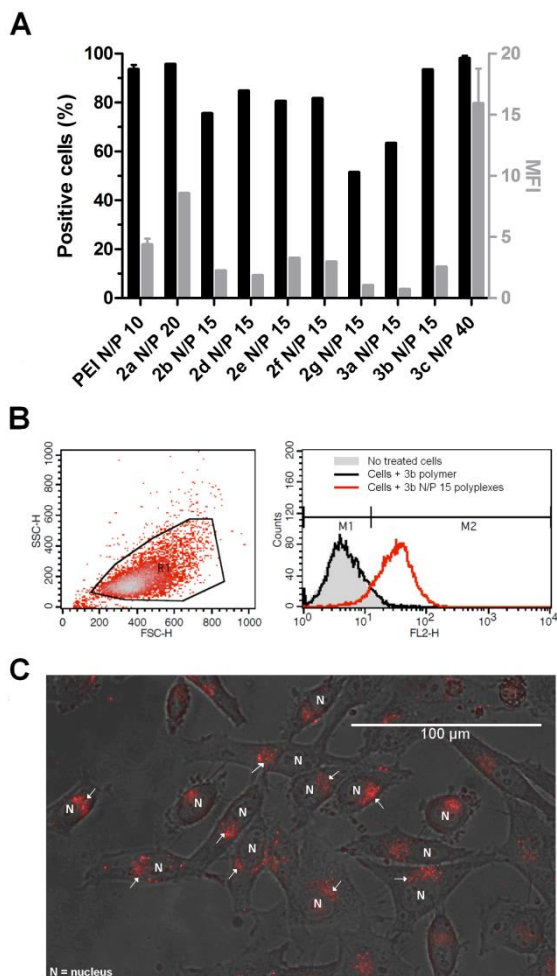


Fig. 5. **(A)** FACS results of HeLa cells transfected with 100 nM of fluorescently labeled siRNA for each polyplex sample according to control cells. Percentage of positive cells transfected with the fluorescently labeled siRNA and mean fluorescent intensity (MFI). **(B)** FACS plot corresponding to cells treated with the fluorescent **3b** polyplexes. **(C)** HeLa cells treated with **3b** fluorescent polyplexes observed under a 40X magnification using an EVOS FL digital inverted fluorescence microscope. Cells were observed under visible and red light and both images were combined.

f. Cytotoxicity

The polymers toxicity was evaluated *in vitro* using a WST-1 viability assay. HeLa cells were treated with polymers at a concentration of 15 µg/mL (concentration corresponding to the one used in polyplexes) for 3 hours and cytotoxicity was measured 24 hours later. These results

highlight that, except **3a**, the cytotoxicity of polycarbonate polymers is significantly lower than for PEI which is well known to induce cellular toxicity [37]. Indeed, **Figure 6** shows that for all tested polymers, the viability of cells was above 75%. In comparison, PEI showed cell viability limited to 23%. This result can be explained by the high positive charge density of PEI in comparison to the tested polycarbonate polymers. PEI displays a higher percentage of positive charges on its structure than polycarbonate polymer samples with similar weight. Polycarbonates are also considered bioreducible [29], as they decrease the intracellular accumulation and thus the intracellular toxicity. The result obtained for the polycarbonate **3a** was however unexpected and surprising. This polymer has, despite its similar structure to the other tested polycarbonate polymers tested, an unexplained toxicity very similar to that observed for PEI. A toxic residue from the synthesis or a contamination during the preparation step might be the cause of this abnormal toxicity but this must be confirmed.

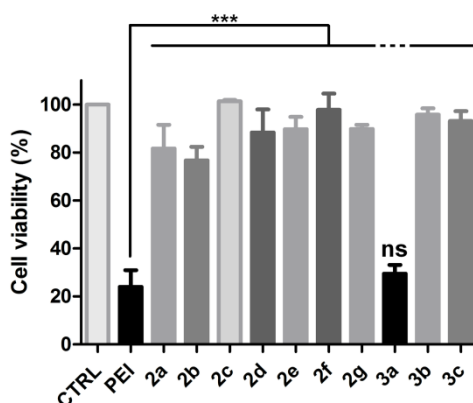


Fig. 6. Cell viability of HeLa cells treated for 3 hours with different polymers at a concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The percentage is related to non-treated cells (100%), and blank wells without cells (0%). Statistical comparison between PEI and polycarbonates was performed by using one-way ANOVA, followed by the Dunnett's test. A p -value < 0.05 was considered significant (mean \pm SEM, $n=4$).

g. Polyplex silencing efficacy

The efficiency of both HDAC7 and HDAC5 siRNA was investigated by quantitative real-time RT-PCR and western blot assay. The relative HDAC7 and HDAC5 mRNA and protein expression levels were assessed after the treatment of HeLa cells with polyplexes. To exclude non-specific effects of polymers, the relative HDAC7 and HDAC5 mRNA expression is normalized to cells

treated with the same polyplexes but containing irrelevant siRNA. The same control conditions were also used for the western blot.

A significant decrease of HDAC7 and HDAC5 mRNA was observed in HeLa cells treated with **3c** polyplexes. Indeed, 48 hours after the transfection, the relative expression of HDAC7 mRNA following treatment with **3c** N/P 40 polyplexes is 47% (**Figure 7A**) while the relative HDAC5 mRNA expression is 42 % (**Figure 7B**). This knock down of both HDAC7 and HDAC5 using the **3c** polyplexes was as stronger as the one observed with the control polyplexes PEI. The depletion of these two target genes was also confirmed by western blot (**Figures 7C-D**) where we can see that the protein level of both HDAC7 and HDAC5 was similarly reduced when comparing PEI and **3c** polyplexes.

To assess the biological relevance of HDAC5 depletion in cancer cells, we also assessed the expression level of E2F1, a gene downregulated in absence of HDAC5 [18]. After treatment with **3c** N/P 40 polyplexes (100 nM in HDAC5 siRNA), the expression of E2F1 transcription factor is decreased according to our previous work [18] suggesting that the **3c** polyplexes can recapitulate the biological effect of HDAC5 depletion in cancer cells.

For the other polycarbonate polyplexes (**2a**, **2b**, **2d**, **2e**, **2f**, **2g** and **3a**), despite satisfactory flow cytometry results for most of them (see **Figure 5A**), these polymers did not exhibit any significant silencing of both HDAC7 and HDAC5. In order to explain this lack of efficiency, a hypothesis could come from the low buffering capacity of these polymers compared to PEI and **3c**. These polyplexes might be degraded in the lysosome after endosomal internalization. Interestingly, polyplexes **3b** were also ineffective in decreasing the expression of HDAC7 or HDAC5. This is surprising since their buffer capacity is higher than that observed for PEI and should be sufficient to enable endosomal escape and the subsequent release of the polyplex into the cytoplasm. We therefore hypothesize that the lack of efficacy in this case is due to a too high affinity between the polymer and the siRNA preventing the siRNA to freely play its role. The presence of a hydrophobic chain in the polymer structure of **3c**, however, could effectively decrease the affinity between polymer and siRNA into the cytoplasm. Correspondingly, polyplexes formed with this polymer show a specific decrease of HDAC7 and HDAC5 at both mRNA and protein level.

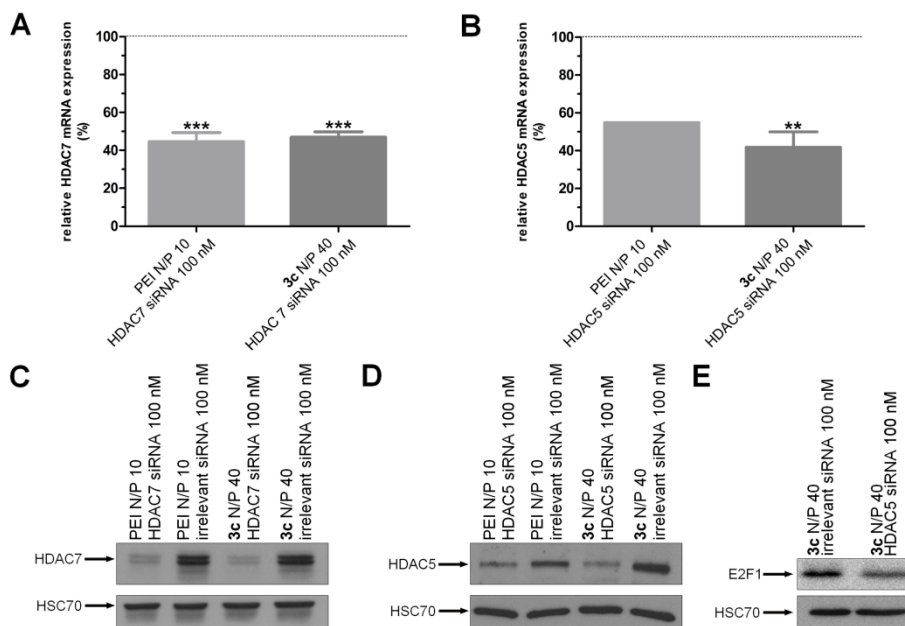


Fig. 7. **(A)** Relative HDAC7 and **(B)** HDAC5 mRNA expression determined by RT-qPCR 48 hours after transfection with PEI N/P 10 and **3c** N/P 40 polyplexes. Values are mean \pm SEM of three biological replicates, expressed relative to β -actine, and normalized to the value of irrelevant siRNA-transfected. Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA, followed by a Turkey's test compared to control values of 100 %. A p -value < 0.05 was considered significant. Silencing of HDAC7 **(C)** and HDAC5 protein **(D)** under the same conditions of treatment. **(E)** E2F1 expression in HeLa cells 30 hours after treatment with **3c** N/P 40 polyplexes. HSC70 was used as loading control.

h. Conclusions

In this work, different guanidinium and/or morpholino functionalized polycarbonate were synthesized by organocatalytic ROP and we evaluated the impact of different functionalities (morpholino-, guanidinium-, hydrophobic groups), of the architecture (from linear homopolymer to dumbbell-shape) and of the molecular weight of these copolymers on their capacity to form polyplexes and to decrease the expression of two targeted proteins *in vitro*.

Our results demonstrated that while morpholine functionalities are able to increase the buffering capacity of polymers, compounds containing only morpholine functionalities are unable to complex siRNA.

In contrast, copolymers composed of only guanidine functionalities are able to form polyplexes. While low molecular weight copolymers have a low affinity for siRNA, guanidinium functional polycarbonate with an average molecular weight above 10 000 g.mol⁻¹ form, at their optimal N/P ratio, nanoparticles with diameters between 150 and 600 nm and a slightly positive ζ potential, two features required for *in vivo* application. More than 60% of HeLa cells incorporate these polyplexes. However, no decrease of the expression of HDAC7 protein was observed. To explain this lack of efficiency, two hypotheses were considered: (i) an insufficient buffering capacity of the polymer, which prevents the release of siRNA from the endosome or (ii) an excessive affinity of the polymer for the siRNA which prevents decomplexation and the release of free siRNA which is required for its activity.

The low buffering effect of the guanidinium polymers was proved by titration and in order to increase this capacity, morpholine functionalities were added to the guanidinium polymer. Mixing both functionalities increases the buffer capacity of the polymers reaching the buffering capacity of PEI when the ratio morpholine/guanidine is close to 1. However, this increased buffer capacity was not sufficient to increase the efficacy of the polymers. All of the guanidinium/morpholino copolymers show good physicochemical characteristics, transfect HeLa cells but were not able to decrease the expression of HDAC7 whatever their linear or ramified structure.

To reduce the affinity of the polymer to the siRNA, a group with a more hydrophobic nature was introduced [29]. A trimethylene carbonate group was added at the end of the cationic chain and allowed knocking down the targeted mRNA coding either for HDAC7 or HDAC5 protein. Indeed, polyplexes formed with this polymer (**3c**) show a specific decrease of HDAC7 and HDAC5 at both mRNA and protein level. The higher hydrophobicity of this polymer probably decreases its affinity for siRNA and consequently, promotes the release of the siRNA into the cytoplasm of transfected cells. This lower affinity between the polymer and the siRNA was observed in gel retardation assays where we observed a destabilization of the nanoparticles upon application of the electric field (see **Figure 2A**) while complexation is close to 100 % by the RiboGreen[®] assay. In addition, gel retardation assay was also used to show the nuclease resistance of siRNA combined with this polymer (data not shown).

The trimethylene carbonate group also made the polymer more amphiphilic. This amphiphilic property of the **3c** polymer confers the possibility to form micelles in aqueous solution when the polymer concentration is above the critical micelle concentration (CMC). Above the CMC, the size is more homogenous and the stability is increased [48, 65]. This property of the polymer

could also increase the endosomal escape, due to pH-dependent membrane disruptive activity [66]. These hypotheses will be investigated in a future work.

Guanidinium-rich amphipathic polycarbonates are a new promising class of polymers for the vectorization of active molecules due to their high biodegradability characteristics [10]. Very few studies actually describe the use of such systems. Compared to Geihe's oligocarbonates, this new **3c** polymer carries morpholine functionalities in addition to the guanidinium to increase the buffering capacity, essential for the release from the endosome. In addition, our polymer allow the spontaneous formation of nanoparticles of a size compatible with an *in vivo* administration (150 nm), without the use of an additional co-polymer or co-oligomer. This size range is optimal for long circulating nanoparticles and increases the accumulation in the tumor due to the EPR effect [2, 61].

The combination of both morpholine and guanidine functionalities at the ratio >1 with a hydrophobic group on the copolymer structure seems to be crucial for the activity of the polymer. Guanidine functionalities are necessary to bind siRNA through electrostatic interactions while morpholine functionalities are essential to confer buffer capacities and the proton sponge effect to the polymer. Hydrophobic poly(trimethylene) carbonate chain is essential to increase the amphipathic character of the polymer (**Figure 8**).

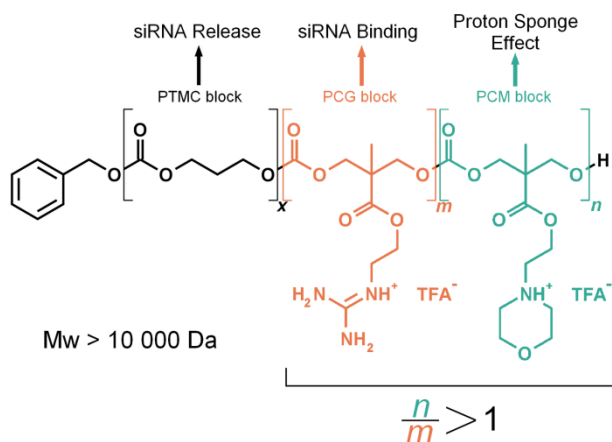


Fig. 8. Structure of the *Bz-b*-PCG-*b*-PCM (**3c**) polymer and properties of the different blocks.

In conclusion, polyplexes formed through self-assembly of HDAC7 or HDAC5 siRNA and a cationic polycarbonate combining guanidine/morpholine functionalities and hydrophobic group have demonstrated promising physicochemical characteristics and an *in vitro* efficiency

potentially suitable for a future use in gene therapy. Moreover, this polymer shows a lower cytotoxicity compared to that of the well-known standard PEI while possessing similar activity in terms of inhibition of proteins of interest *in vitro*.

In our future work, we aim to optimize this formulation by combining thereof to a PEGylated polymer and a specific ligand to confer stealth properties to this polyplex and target specific cells in order to increase the chances of *in vivo* use.

i. Acknowledgments

Authors thank the Belgium National Fund for Scientific Research (<http://www.frs-fnrs.be>), TELEVIE, the Centre Anti-Cancéreux and Fonds Léon Frédéricq près de l'Université de Liège for funding. The authors thank the GIGA "Cell Imaging and Flow Cytometry" core facility for their help with microscopy and imaging analysis as well as Laurence Collard, Catherine Polese and Nicolas Mathéus for technical and scientific support. CIRMAP is grateful to the "Belgian Federal Government Office Policy of Science (SSTC)" for general support in the frame of the PAI-7/05, the European Commission and the Wallonia Region (FEDER Program) and OPTI2MAT program of excellence. DM is Research Associates at the National Fund for Scientific Research (FNRS). EH is a FNRS-TELEVIE fellow. AF is a FNRS Fellow.

I.2.2. SUPPORTING INFORMATION

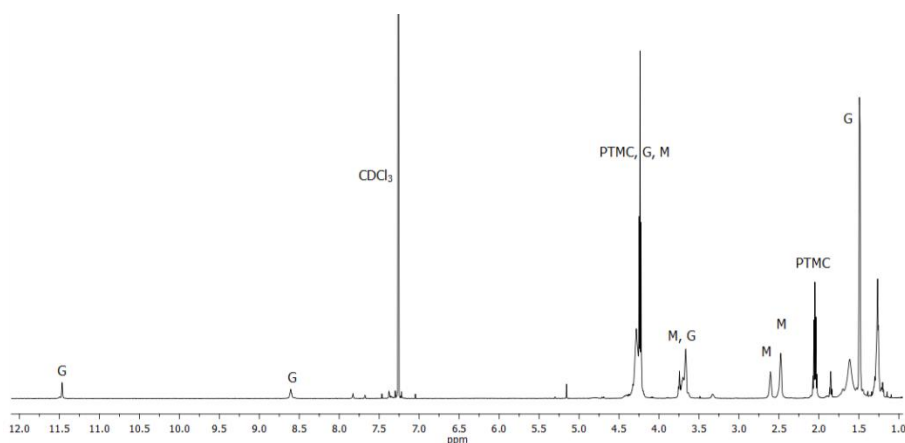


Fig. S1. Typical ^1H NMR spectrum of polymer **3c** before deprotection (*Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM in CDCl_3 , 500 MHz). Resonances assigned with PTMC, M and G correspond to the PTMC, PCM and PCG blocks, respectively.

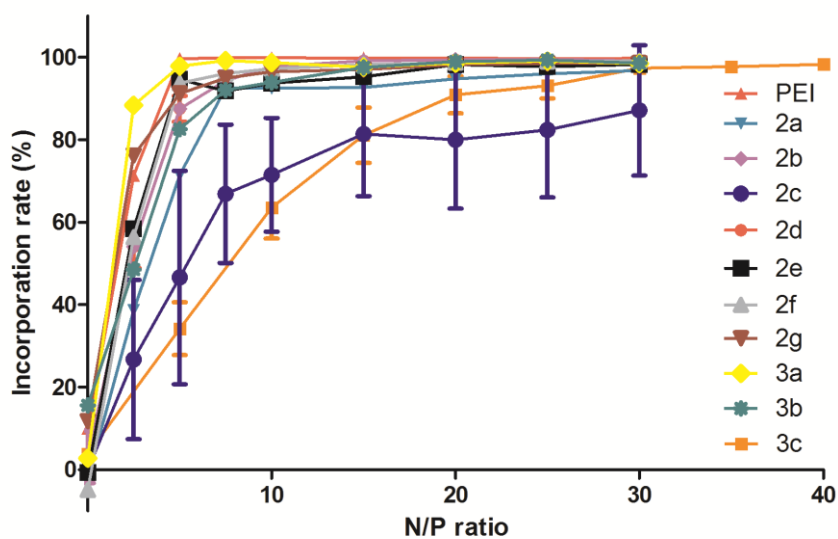


Fig. S2. Incorporation rate of polyplexes according to the N/P ratio determined by the Quant-iT™ RiboGreen® RNA reagent (mean \pm SEM).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

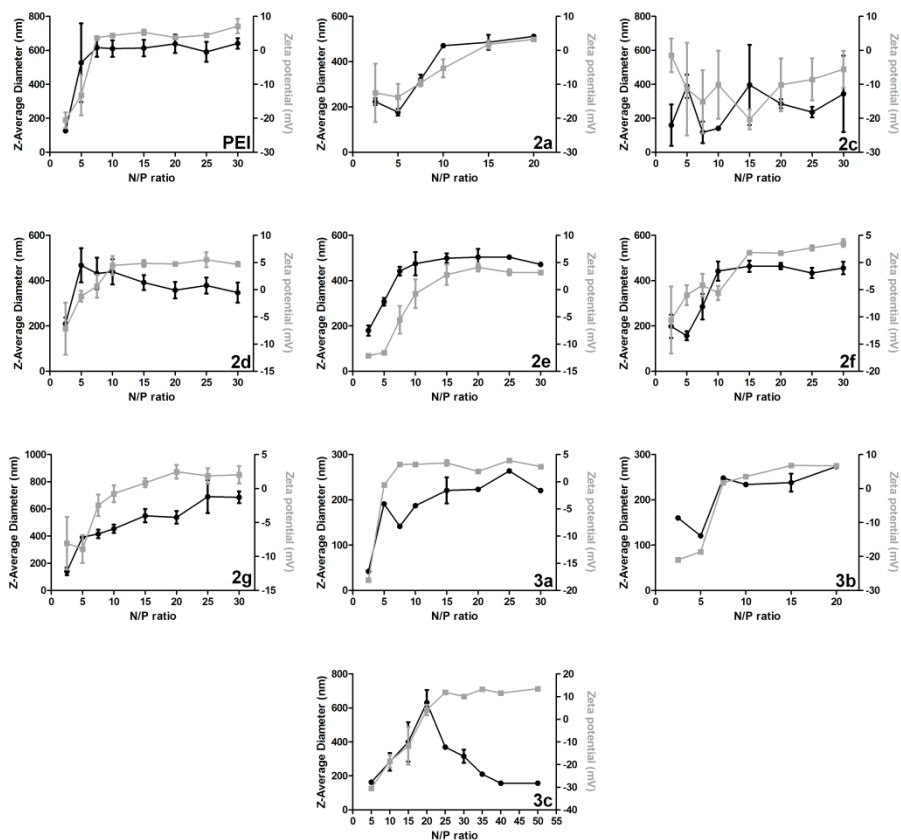


Fig. S3. Z-average diameter and ζ potential of polyplexes as a function of the N/P ratio (mean \pm SEM).

I.2.3. RÉSULTATS NON PUBLIÉS

En plus des 11 polymères détaillés dans la publication, 16 autres polymères ont fait partie de l'étude. Les polyplexes formés avec ces polymères ont été testés selon les mêmes protocoles que ceux décrits dans la publication.

Comme observé pour le polymère **1a** de la publication, les polymères **1** et **2** (Tableau I.1), qui ne contiennent que des groupements morpholines, ne sont pas capables de complexer le siRNA pour former des polyplexes.

Pour les autres, contenant des fonctions guanidines et morpholines, nous avons observé qu'une masse moléculaire inférieure à 10 kDa ne permet souvent qu'une complexation partielle du siRNA (polymères **7**, **11**, **14** et **16** du Tableau I.1).

Concernant la taille et la charge des polyplexes au rapport N/P optimal, les polymères **5** à **10** et **12** forment des polyplexes d'un diamètre compris entre 50 et 300 nm, et présentant un potentiel zêta légèrement positif (Tableau I.1).

Les polymères amphiphiles autres que le **3c** de la publication (polymères **11** à **16**) forment des polyplexes avec une taille trop élevée et/ou un potentiel zêta qui reste négatif malgré l'augmentation du rapport N/P. La taille négligeable de leur groupement hydrophobe (cholestérol, alcool benzylique ou dodécane-thiol) par rapport au reste de la structure moléculaire du polymère ne suffit probablement pas à former des micelles stables comme avec le polymère **3c**.

Au niveau du pouvoir tampon, les observations sont identiques : les fonctions guanidines n'apportent pas de pouvoir tampon (polymère **4**) et celui-ci augmente en fonction du rapport morpholine/guanidine. Une faible proportion de morpholines apporte un léger pouvoir tampon (« + » dans le Tableau I.1) jusqu'à atteindre le pouvoir tampon du PEI à un rapport de 1 (+++). Le pouvoir tampon devient même supérieur à celui du PEI avec un rapport supérieur à 1 (++++). Par contre, malgré des caractéristiques parfois idéales associées à une entrée de plus de 90 % dans les cellules, aucun de ces polymères ne montre une efficacité de dégradation de l'ARNm.

Tableau I.1. Résumé des résultats obtenus pour les polymères non publiés (PEO : bloc de polyéthylène glycol ; PCM : bloc de polycarbonate aliphatique contenant des groupements morpholines ; PCG : bloc de polycarbonate aliphatique contenant des groupements guanidines ; BN : alcool benzylique ; DDT : dodécaneéthiol ; CHOL : cholestérol ; PTMC : bloc de polycarbonate aliphatique).

N°	Polymère	M_n ($g \cdot mol^{-1}$)	Complexation du siRNA	Taille (N/P optimal)	Charge (N/P optimal)	Taux d'endocytose (% cellules transfectées)	Pouvoir tampon	Efficacité
À base de morpholine								
1	PEO- <i>b</i> -PCM	6100	Aucune	/	/	/	/	/
2	PCM- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PCM	7800	Aucune	/	/	/	/	/
A base de guanidine								
3	PCG- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PCG	8100	+ de 90%	195,4 nm	-21,5 mV	4 %	/	/
4	(PCG) ₄ - <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -(PCG) ₄	175100	+ de 90%	443,6 nm	+3,7 mV	52 %	Aucun	Aucune
À base de morpholine et guanidine								
5	PEO- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	28700	+ de 90%	162,6 nm	+3,5 mV	/	+	/
6	PEO- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	30000	+ de 90%	227 nm	+4,2 mV	/	+	/
7	PEO- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	8470	Partielle	230,7 nm	+2,3 mV	5 %	+++	/
8	PEO- <i>b</i> -PCG- <i>ran</i> -PCM	33500	+ de 90%	210,6 nm	+5,1 mV	/	+	/
9	PEO- <i>b</i> -PCG- <i>ran</i> -PCM	22500	+ de 90%	209,1 nm	+6,4 mV	/	+	/
Amphiphiles et à base de morpholine et guanidine								
10	PEO- <i>b</i> -PCG- <i>ran</i> -PCM	54200	+ de 90%	157,6 nm	+2,9 mV	94 %	+++	Aucune
11	BN- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	6950	Partielle	362,5 nm	-10,3 mV	56 %	+++	Aucune
12	BN- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	15510	+ de 90%	416,4 nm	+3,7 mV	94 %	++	Aucune
13	BN- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	17640	+ de 90%	833,2 nm	+3,9 mV	95 %	++++	Aucune
14	DDT- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	5950	Partielle	581,6 nm	+1,12 mV	/	+++	/
15	CHOL- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	8290	+ de 90%	567,9 nm	-5,2 mV	/	+++	/
16	PTMC- <i>b</i> -PCG- <i>b</i> -PCM	4810	Partielle	712,4 nm	-11,7 mV	/	+++	/

/ : paramètre non testé

I.3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Différents polymères polycarbonates aliphatiques contenant des fonctions guanidines et/ou morpholines ont été étudiés afin d'obtenir des polyplexes capables de réduire l'expression de la protéine cible *in vitro* tout en possédant des caractéristiques physico-chimiques compatibles avec une administration IV.

La capacité des polymères à former des polyplexes avec le siRNA a été évaluée en fonction de plusieurs caractéristiques du polymère, comme sa structure, sa masse moléculaire, la présence de groupement PEG, de fonctions guanidines et/ou morpholines et la présence ou non d'un groupement hydrophobe.

Nous avons observé que la capacité à complexer le siRNA est directement liée à la présence de fonctions chargées positivement au pH de préparation des polyplexes (pH 7,5). Ces fonctions peuvent ainsi former des liaisons électrostatiques avec le siRNA, chargé négativement. À cette valeur de pH, les fonctions guanidines sont ionisées et peuvent donc lier le siRNA, contrairement aux fonctions morpholines qui sont majoritairement non ionisées et n'interagissent pas avec le siRNA.

En effet, avec un pKa d'environ 12,5, les fonctions guanidines apportent au polymère une charge positive à pH neutre. Cette charge positive permet au polymère de se lier au siRNA chargé négativement. Par contre, les fonctions morpholines sont caractérisées par un pKa intrinsèque de 8,36, mais celui-ci diminue une fois la fonction greffée au polymère. Au pH de préparation des polyplexes (pH 7,5), les fonctions morpholines ne sont donc pas suffisamment chargées pour complexer le siRNA [38].

La masse moléculaire du polymère influence aussi sa capacité à former des polyplexes. En dessous de 10 kDa, les polymères (**2c**, **7**, **11**, **14** et **16**) ne complexent que partiellement le siRNA. Comme cela a déjà été montré par d'autres auteurs, cela s'explique par une faible stabilisation de la nanoparticule formée par des polymères de faible masse moléculaire [9]. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en relation les caractéristiques des polyplexes avec l'architecture linéaire ou ramifiée du polymère ou avec la disposition, aléatoire ou en bloc, des fonctions guanidines et morpholines.

Les groupements guanidines, en plus de leur rôle dans la complexation du siRNA, sont aussi utiles pour l'interaction avec les membranes cellulaires. En effet, le peptide TAT (RKKRRQRRR) du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), riche en arginine, est caractérisé par une entrée cellulaire élevée grâce à la présence d'une fonction guanidine à l'extrémité de la chaîne latérale des arginines [67]. Cependant, elles n'apportent aucun pouvoir tampon au polymère. Ce pouvoir tampon peut être augmenté par l'ajout de fonctions morpholines à la structure du polymère, en plus des fonctions guanidines nécessaires à la complexation du siRNA et à la pénétration cellulaire. En effet, grâce à leur pKa, les fonctions morpholines sont considérées comme des bases faibles. Non-chargées à pH neutre, elles sont par contre capables de capturer des protons lors d'une diminution du pH, comme celle observée lors de l'acidification de l'endosome [38]. Ce pouvoir tampon des fonctions morpholines peut être utile pour assurer le mécanisme « d'éponge à protons », afin de faciliter la libération de l'endosome. Afin d'atteindre un pouvoir tampon supérieur à celui du PEI [6, 7], un rapport morpholine/guanidine légèrement supérieur à 1 est nécessaire.

Les analyses de cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence montrent que la plupart des polyplexes formés (**2a**, **2b**, **2d**, **2e**, **2g**, **2f**, **3a** et **3b**) sont capables d'entrer dans les cellules par endocytose, mais malgré que certains possèdent un pouvoir tampon théoriquement suffisant pour permettre la libération de l'endosome, aucun n'a montré une efficacité de dégradation de l'ARNm.

La présence d'un bloc hydrophobe de polycarbonate aliphatique, en plus des blocs guanidines et morpholines, a apporté un caractère amphiphile au polymère (Figure I.3). Celui-ci a finalement permis de former des polyplexes capables de relarguer le siRNA et de dégrader efficacement l'ARNm cible. Notre hypothèse est que les propriétés amphiphiles du polymère lui permettraient de former des micelles en solution aqueuse. Selon la littérature, cette conformation sous la forme de micelles augmenterait la stabilité des particules, tout en favorisant le relargage de l'endosome grâce à leur capacité à perturber les membranes, et à ainsi provoquer la libération du siRNA dans le cytoplasme [12, 48, 65, 68]. Cependant, les autres polymères amphiphiles testés ne forment pas de polyplexes efficaces. La petite taille de leur groupement hydrophobe par rapport au reste du polymère ne suffit probablement pas à former des micelles stables.

Au terme de cette première étude, un polymère capable de former des polyplexes efficaces *in vitro* a été identifié (*Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM). Celui-ci possède une masse moléculaire légèrement supérieure à 10 kDa. Sa structure est formée d'un bloc hydrophobe (PTMC), d'un

bloc contenant des fonctions guanidines (PCG) et puis d'un dernier bloc contenant des fonctions morpholines (PCM), avec un ratio morpholine/guanidine supérieur à 1 (Figure I.3). Ces caractéristiques permettent d'obtenir des polyplexes encapsulant 100 % du siRNA, avec une taille inférieure à 200 nm et une charge de surface légèrement positive à partir d'un rapport N/P de 40. Ceux-ci sont capables d'être endocytés par les cellules HeLa, d'être libérés de l'endosome afin de finalement relarguer le siRNA dans le cytoplasme, conduisant à une diminution de l'expression d'environ 50 % de la protéine ciblée (HDAC5 ou HDAC7), 48 heures après la transfection.

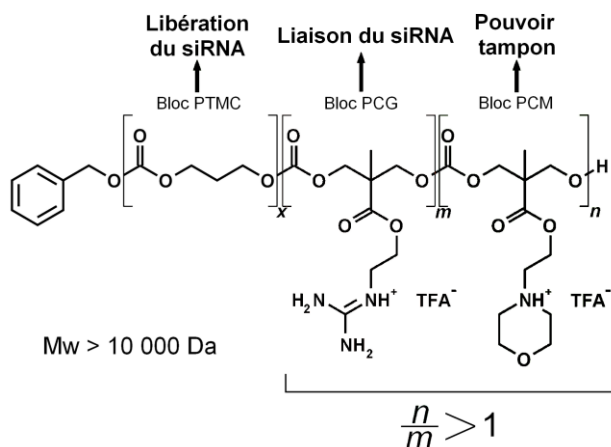


Figure I.3. Structure du polymère *Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM (**3c**) et les propriétés apportées par les différents blocs.

Ces résultats sont encourageants pour une future utilisation *in vivo* des polymères polycarbonates afin d'administrer du siRNA. Cependant, contrairement à de nombreux polymères testés (**1a**, **2a-f**, **2g**, **3a**, **3b**, et **1 à 10**), le polymère **3c** ne possède pas de chaîne de PEG sur sa structure. Or, comme décrit dans la partie introductive, la présence de PEG pourrait diminuer l'adsorption des protéines plasmatiques et augmenter la furtivité en milieu sanguin, propriétés nécessaires à l'administration IV. Dans le chapitre suivant, nous allons donc étudier l'influence de l'ajout d'une chaîne de PEG sur le polymère **3c**.

I.4. RÉFÉRENCES

- Bertrand, N., Leroux, J.C., *The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective*, J Control Release, 2012. **161**(2): 152-163.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*, Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): 271-284.

3. Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D., *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): 12349-12354.
4. Walkey, C.D., Chan, W.C., *Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment*, Chem Soc Rev, 2012. **41**(7): 2780-2799.
5. Gary, D.J., Min, J., Kim, Y., Park, K., Won, Y.Y., *The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-Based siRNA Complexes*, Macromol Biosci, 2013. **13**(8): 1059-1071.
6. Merkel, O.M., Kissel, T., *Quo vadis polyplex?*, J Control Release, 2014. **190**: 415-423.
7. Li, N., Zhao, L., Qi, L., Li, Z., Luan, Y., *Polymer assembly: Promising carriers as co-delivery systems for cancer therapy*, Progress in Polymer Science, 2015. In Press.
8. Frère, A., Kawalec, M., Tempelaar, S., Peixoto, P., Hendrick, E., Peulen, O., *et al.*, *Impact of the Structure of Biocompatible Aliphatic Polycarbonates on siRNA Transfection Ability*, Biomacromolecules, 2015. **16**(3): 769-779.
9. Gary, D.J., Puri, N., Won, Y.Y., *Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery*, J Control Release, 2007. **121**(1-2): 64-73.
10. Geihe, E.I., Cooley, C.B., Simon, J.R., Kiesewetter, M.K., Edward, J.A., Hickerson, R.P., *et al.*, *Designed guanidinium-rich amphipathic oligocarbonate molecular transporters complex, deliver and release siRNA in cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): 13171-13176.
11. Li, J., Chen, Q., Zha, Z., Li, H., Toh, K., Dirisala, A., *et al.*, *Ternary polyplex micelles with PEG shells and intermediate barrier to complexed DNA cores for efficient systemic gene delivery*, J Control Release, 2015. **209**: 77-87.
12. Eltoukhy, A.A., Chen, D., Alabi, C.A., Langer, R., Anderson, D.G., *Degradable terpolymers with alkyl side chains demonstrate enhanced gene delivery potency and nanoparticle stability*, Adv Mater, 2013. **25**(10): 1487-1493.
13. Nishimura, Y., Mieda, H., Ishii, J., Ogino, C., Fujiwara, T., Kondo, A., *Targeting cancer cell-specific RNA interference by siRNA delivery using a complex carrier of affibody-displaying bio-nanocapsules and liposomes*, J Nanobiotechnology, 2013. **11-19**: 19.
14. Castanotto, D., Rossi, J.J., *The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics*, Nature, 2009. **457**(7228): 426-433.
15. Gao, K., Huang, L., *Achieving efficient RNAi therapy: Progress and challenges*, Acta Pharmaceutica Sinica B, 2013. **3**(4): 213-225.
16. Mottet, D., Castronovo, V., *Histone Deacetylases : Anti-Angiogenic Targets in Cancer Therapy*, Current Cancer Drug Target, 2012. **10**: 898-913.
17. Mottet, D., Bellahcene, A., Pirotte, S., Waltregny, D., Deroanne, C., Lamour, V., *et al.*, *Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis*, Circulation Research, 2007. **101**(12): 1237-1246.
18. Peixoto, P., Castronovo, V., Matheus, N., Polese, C., Peulen, O., Gonzalez, A., *et al.*, *HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells*, Cell Death & Differentiation, 2012. **19**(7): 1239-1252.
19. 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, 2013. **34**(27): 6429-6443.
20. Owens, D.E., 3rd, Peppas, N.A., *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*, Int J Pharm, 2006. **307**(1): 93-102.
21. Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G., Haisma, H.J., *Endosomal escape pathways for delivery of biologicals*, J Control Release, 2011. **151**(3): 220-228.
22. Bareford, L.M., Swaan, P.W., *Endocytic mechanisms for targeted drug delivery*, Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(8): 748-758.
23. Tietze, N., Pelisek, J., Philipp, A., Roedel, W., Merdan, T., Tarcha, P., *et al.*, *Induction of apoptosis in murine neuroblastoma by systemic delivery of transferrin-shielded siRNA polyplexes for downregulation of Ran*, Oligonucleotides, 2008. **18**(2): 161-174.
24. Cavallaro, G., Licciardi, M., Amato, G., Sardo, C., Giammona, G., Farra, R., *et al.*, *Synthesis and characterization of polyaspartamide copolymers obtained by ATRP for nucleic acid delivery*, International Journal of Pharmaceutics, 2014. **466**(1-2): 246-257.
25. Tros de Ilarduya, C., Sun, Y., Duzgunes, N., *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*, Eur J Pharm Sci, 2010. **40**(3): 159-170.
26. Kang, H.C., Huh, K.M., Bae, Y.H., *Polymeric nucleic acid carriers: current issues and novel design approaches*, J Control Release, 2012. **164**(3): 256-264.

27. Yousefi, A., Storm, G., Schifflers, R., Mastrobattista, E., *Trends in polymeric delivery of nucleic acids to tumors*, J Control Release, 2013. **170**(2): 209-218.
28. Han, L., Tang, C., Yin, C., *Effect of binding affinity for siRNA on the in vivo antitumor efficacy of polyplexes*, Biomaterials, 2013. **34**(21): 5317-5327.
29. Zhu, K.J., Hendren, R.W., Jensen, K., Pitt, C.G., *Synthesis, properties, and biodegradation of poly(1,3-trimethylene carbonate)*, Macromolecules, 1991. **24**(8): 1736-1740.
30. Le Hellaye, M., Fortin, N., Guilloteau, J., Soum, A., Lecommandoux, S., Guillaume, S.M., *Biodegradable polycarbonate-b-polypeptide and polyester-b-polypeptide block copolymers: synthesis and nanoparticle formation towards biomaterials*, Biomacromolecules, 2008. **9**(7): 1924-1933.
31. Ong, Z.Y., Fukushima, K., Coady, D.J., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Rational design of biodegradable cationic polycarbonates for gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 120-126.
32. Allen, C., Dos Santos, N., Gallagher, R., Chiu, G.N.C., Shu, Y., Li, W.M., et al., *Controlling the Physical Behavior and Biological Performance of Liposome Formulations Through Use of Surface Grafted Poly(ethylene Glycol)*, Bioscience Reports, 2002. **22**(2): 225-250.
33. Dominska, M., Dykxhoorn, D.M., *Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape*, J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 8): 1183-1189.
34. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): 7297-7301.
35. Hatakeyama, H., Akita, H., Kogure, K., Oishi, M., Nagasaki, Y., Kihira, Y., et al., *Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid*, Gene Ther, 2007. **14**(1): 68-77.
36. Pollard, H., Remy, J.S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J.P., Escande, D., *Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells*, J Biol Chem, 1998. **273**(13): 7507-7511.
37. Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G., Szewczyk, A., *A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy*, Mol Ther, 2005. **11**(6): 990-995.
38. Reschner, A., Shim, Y.H., Dubois, P., Delvenne, P., Evrard, B., Marcelis, L., et al., *Evaluation of a new biocompatible poly(N-(morpholino ethyl methacrylate)-based copolymer for the delivery of ruthenium oligonucleotides, targeting HPV16 E6 oncogene*, J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(8): 1432-1440.
39. Shrestha, R., Elsbahy, M., Florez-Malaver, S., Samarajeewa, S., Wooley, K.L., *Endosomal escape and siRNA delivery with cationic shell crosslinked knedel-like nanoparticles with tunable buffering capacities*, Biomaterials, 2012. **33**(33): 8557-8568.
40. Goncalves, C., Berchel, M., Gosselin, M.P., Malard, V., Cheradame, H., Jaffres, P.A., et al., *Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethylenimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection*, Int J Pharm, 2014. **460**(1-2): 264-272.
41. Rokicki, G., *Aliphatic cyclic carbonates and spiroorthocarbonates as monomers*, Progress in Polymer Science, 2000. **25**(2): 259-342.
42. Lu, L., Huang, K., *Preparation of poly(propylene-co-γ-butyrolactone carbonate) and release profiles of drug-loaded microcapsules*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2005. **43**(12): 2468-2475.
43. Lakadamyali, M., Rust, M.J., Zhuang, X., *Ligands for Clathrin-Mediated Endocytosis Are Differentially Sorted into Distinct Populations of Early Endosomes*, Cell, 2006. **124**(5): 997-1009.
44. Tempelaar, S., Mespouille, L., Coulembier, O., Dubois, P., Dove, A.P., *Synthesis and post-polymerisation modifications of aliphatic poly(carbonate)s prepared by ring-opening polymerisation*, Chem Soc Rev, 2013. **42**(3): 1312-1336.
45. Pratt, R.C., Nederberg, F., Waymouth, R.M., Hedrick, J.L., *Tagging alcohols with cyclic carbonate: a versatile equivalent of (meth)acrylate for ring-opening polymerization*, Chem Commun (Camb), 2008. (1): 114-116.
46. Dove, A.P., Pratt, R.C., Lohmeijer, B.G., Waymouth, R.M., Hedrick, J.L., *Thiourea-based bifunctional organocatalysis: supramolecular recognition for living polymerization*, J Am Chem Soc, 2005. **127**(40): 13798-13799.
47. Araki, J., Zhao, C., Ito, K., *Efficient Production of Polyrotaxanes from α-Cyclodextrin and Poly(ethylene glycol)*, Macromolecules, 2005. **38**(17): 7524-7527.
48. Liu, K.L., Goh, S.H., Li, J., *Controlled synthesis and characterizations of amphiphilic poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate]-poly(ethylene glycol)-poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate] triblock copolymers*, Polymer, 2008. **49**(3): 732-741.

49. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*, *Methods*, 2001. **25**(4): 402-408.
50. Yang, C., Ong, Z.Y., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Novel biodegradable block copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and cationic polycarbonate: effects of peg configuration on gene delivery*, *Macromol Rapid Commun*, 2011. **32**(22): 1826-1833.
51. Synatschke, C.V., Schallon, A., Jerome, V., Freitag, R., Muller, A.H., *Influence of polymer architecture and molecular weight of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) polyocations on transfection efficiency and cell viability in gene delivery*, *Biomacromolecules*, 2011. **12**(12): 4247-4255.
52. Bartolini, C., Mespouille, L., Verbruggen, I., Willem, R., Dubois, P., *Guanidine-based polycarbonate hydrogels: from metal-free ring-opening polymerization to reversible self-assembling properties*, *Soft Matter*, 2011. **7**(20): 9628-9637.
53. Mespouille, L., Coulembier, O., Kawalec, M., Dove, A.P., Dubois, P., *Implementation of metal-free ring-opening polymerization in the preparation of aliphatic polycarbonate materials*, *Progress in Polymer Science*, 2014. **39**(6): 1144-1164.
54. Kiesewetter, M.K., Scholten, M.D., Kirn, N., Weber, R.L., Hedrick, J.L., Waymouth, R.M., *Cyclic Guanidine Organic Catalysts: What Is Magic About Triazabicyclodecene?*, *The Journal of Organic Chemistry*, 2009. **74**(24): 9490-9496.
55. Kiesewetter, M.K., Shin, E.J., Hedrick, J.L., Waymouth, R.M., *Organocatalysis: Opportunities and Challenges for Polymer Synthesis*, *Macromolecules*, 2010. **43**(5): 2093-2107.
56. Zhang, L., Pratt, R.C., Nederberg, F., Horn, H.W., Rice, J.E., Waymouth, R.M., *et al.*, *Acyclic Guanidines as Organic Catalysts for Living Polymerization of Lactide*, *Macromolecules*, 2010. **43**(3): 1660-1664.
57. Nederberg, F., Lohmeijer, B.G.G., Leibfarth, F., Pratt, R.C., Choi, J., Dove, A.P., *et al.*, *Organocatalytic Ring Opening Polymerization of Trimethylene Carbonate*, *Biomacromolecules*, 2006. **8**(1): 153-160.
58. Cooley, C.B., Trantow, B.M., Nederberg, F., Kiesewetter, M.K., Hedrick, J.L., Waymouth, R.M., *et al.*, *Oligocarbonate Molecular Transporters: Oligomerization-Based Syntheses and Cell-Penetrating Studies*, *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(45): 16401-16403.
59. Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., *Endocytosis of nanomedicines*, *J Control Release*, 2010. **145**(3): 182-195.
60. Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J.C., Jin, T., Dai, K., *et al.*, *Uptake mechanisms of non-viral gene delivery*, *J Control Release*, 2012. **158**(3): 371-378.
61. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*, *Eur J Pharm Biopharm*, 2008. **69**(1): 1-9.
62. Wender, P.A., Galliher, W.C., Goun, E.A., Jones, L.R., Pillow, T.H., *The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms*, *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(4-5): 452-472.
63. van der Aa, L.J., Vader, P., Storm, G., Schifflers, R.M., Engbersen, J.F., *Optimization of poly(amido amine)s as vectors for siRNA delivery*, *J Control Release*, 2011. **150**(2): 177-186.
64. Shim, M.S., Kwon, Y.J., *Acid-Responsive Linear Polyethylenimine for Efficient, Specific, and Biocompatible siRNA Delivery*, *Bioconjugate Chemistry*, 2009. **20**(3): 488-499.
65. Xiong, X.B., Uludag, H., Lavasanifar, A., *Biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polyesters with grafted polyamines as supramolecular nanocarriers for efficient siRNA delivery*, *Biomaterials*, 2009. **30**(2): 242-253.
66. Nelson, C.E., Kintzing, J.R., Hanna, A., Shannon, J.M., Gupta, M.K., Duvall, C.L., *Balancing Cationic and Hydrophobic Content of PEGylated siRNA Polyplexes Enhances Endosome Escape, Stability, Blood Circulation Time, and Bioactivity in Vivo*, *ACS Nano*, 2013. **7**(10): 8870-8880.
67. Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B., *The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): 13003-13008.
68. Bishop, C.J., Kozielski, K.L., Green, J.J., *Exploring the role of polymer structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles*, *J Control Release*, 2015. **219**: 488-499.

**II. MISE EN ÉVIDENCE DES AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA
PEGYLATION DES POLYCARBONATES EN VUE DE LEUR
ADMINISTRATION *IN VIVO***

Dans l'étude décrite précédemment, nous avons développé un polymère de type polycarbonate de structure *Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM (Figure I.3) qui forme des polyplexes, probablement sous la forme de micelles. Ces polyplexes sont capables d'administrer *in vitro* du siRNA dans le cytoplasme des cellules HeLa, menant à la diminution l'expression de l'ARNm codant pour les protéines HDAC5 ou HDAC7. De plus, ces polyplexes possèdent des caractéristiques physico-chimiques adéquates pour une administration IV. La présence d'un bloc polycarbonate fonctionnalisé par des guanidines (PCG) est utile pour la complexation du siRNA et l'interaction avec les membranes plasmiques [1-3], tandis que le bloc contenant des groupements morpholines (PCM) apporte un pouvoir tampon au polymère afin d'aider les polyplexes à s'échapper de l'endosome en utilisant le mécanisme « d'éponge à protons » [4]. Le bloc hydrophobe de polycarbonate aliphatique (PTMC) apporte un caractère amphiphile au polymère et devrait permettre la formation de micelles en milieu aqueux. La formation de micelles augmenterait la stabilité des polyplexes et leur faculté à perturber les membranes, faciliterait la libération de l'endosome [5-8].

Comme décrit dans l'introduction, afin que les polyplexes puissent traverser les barrières extracellulaires et induire une activité biologique après une administration IV, il est important de limiter l'adsorption des protéines plasmatiques à leur surface et d'augmenter leur furtivité dans le sang. Pour cela, les polymères ont été modifiés en ajoutant des chaînes de PEG. L'ajout de PEG pour former une couronne autour des polyplexes a plusieurs buts. Après l'administration par voie IV, le rôle du PEG est de limiter l'adsorption des protéines plasmatiques autour des polyplexes et d'augmenter leur furtivité, pour éviter la reconnaissance par le système immunitaire [9]. Ces propriétés du PEG sont directement liées à la densité de couverture et la longueur des chaînes de PEG [10]. Cependant, l'augmentation de furtivité apportée par le PEG peut en même temps diminuer les interactions avec les membranes cellulaires et donc diminuer l'entrée cellulaire, la libération de l'endosome et l'efficacité des polyplexes [11].

Dans ce travail, les polymères ont été modifiés en ajoutant des chaînes de PEG 750 ou 2000 Da. Selon la littérature, une masse moléculaire de 2 kDa peut être suffisante pour apporter des propriétés furtives [12]. Des chaînes de PEG de 750 Da ont aussi été utilisées, dans l'objectif de limiter l'éventuelle perte d'efficacité due au PEG, tout en conservant une furtivité suffisante.

Dans cette seconde étude, les polymères PEGylés sont comparés au polymère *Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM précédemment décrit. Nous avons évalué la capacité des polymères PEGylés à former des polyplexes et vérifié que ceux-ci présentent toujours des caractéristiques physico-chimiques

compatibles avec l'administration IV. Pour parvenir jusqu'au site de la tumeur, ces formulations de polyplexes doivent limiter l'adsorption des protéines plasmatiques, ne doivent pas être dégradées par les nucléases, ne doivent pas s'agréger et ne doivent pas être reconnues par le système immunitaire. De plus, lors de leur administration par la voie IV, les polyplexes ne doivent pas présenter de toxicité sanguine ni interférer avec les processus d'homéostasie du système sanguin tels que l'agrégation plaquettaire et la cascade de coagulation. Finalement, arrivés au site de la tumeur, les polyplexes doivent être capables d'entrer dans les cellules cancéreuses et de dégrader l'ARNm ciblé.

La comparaison entre le polymère *Bz-PTMC-b-PCG-b-PCM* non PEGylé et les polymères PEGylés, est présentée dans un article intitulé « *PEGylated and functionalized aliphatic polycarbonate polyplex micelles for intravenous administration of HDAC5 siRNA in cancer therapy* », actuellement en cours de soumission (**II.2.1**) [13].

II.1. Résumé des résultats.....	148
II.2. Résultats	152
II.2.1. Publication	152
II.2.2. Supporting Information	180
II.3. Discussion et conclusions	185

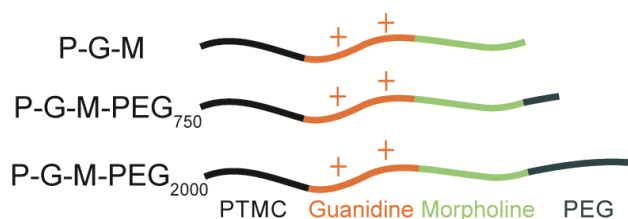
II.1. RÉSUMÉ DES RÉSULTATS

Pour cette étude, trois polymères ont été synthétisés : le polymère P-G-M (nouveau lot du polymère préalablement décrit dans la première étude [14]) et les polymères PEGylés P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀. Ceux-ci conservent une structure similaire au polymère P-G-M, mais contiennent en plus une chaîne de PEG, de 750 ou de 2000 Da lié de manière covalente (Tableau II.1, Figure II.1). La synthèse et la caractérisation de ces polymères ont été réalisées par le SMPC de l'Université de Mons, selon les méthodes décrites dans les sections « Materials and Methods » (**I.2.1.iii**, **II.2.1.iii**) des deux publications [13, 14].

Tableau II.1. Caractéristiques principales des polymères P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀.

Abréviation	Polymère	M_n (g.mol ⁻¹)	N_m/N_g
P-G-M	<i>Bz</i> -PTMC ₃₇ - <i>b</i> -PCG ₈ - <i>b</i> -PCM _{8,5}	10100	1,1
P-G-M-PEG₇₅₀	PEO ₇₅₀ -PCM _{9,5} - <i>b</i> -PCG ₈ - <i>b</i> -PTMC ₅₁	12300	1,2
P-G-M-PEG₂₀₀₀	PEO ₂₀₀₀ -PCM ₁₆ - <i>b</i> -PCG _{10,5} - <i>b</i> -PTMC ₆₃	17700	1,5

N_m/N_g : rapport morpholine/guanidine

Figure II.1. Représentation schématique des polymères P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀.

Ces trois polymères sont capables de complexer totalement le siRNA et de former des polyplexes aux propriétés physico-chimiques en adéquation avec l'administration IV. Ces polyplexes se présentent probablement sous la forme de micelles grâce aux propriétés amphiphiles des polymères. La présence du PEG en surface des micelles permet de réduire le potentiel zêta proportionnellement à la longueur de la chaîne. Celui-ci passe de +11 mV pour les polyplexes P-G-M à +8 mV pour les P-G-M-PEG₇₅₀ et +5 mV pour les P-G-M-PEG₂₀₀₀. Les images de microscopie électronique confirment les mesures de taille obtenues par DLS, et montrent une agrégation pour les polyplexes P-G-M alors que les polyplexes PEGylés semblent s'agréger plus lentement au cours du temps. Afin d'envisager une conservation à plus long terme des formulations, celles-ci ont été lyophilisées et leur stabilité a été vérifiée après 3 mois de conservation sous forme sèche, sous vide à -18°C, en mesurant le taux d'encapsulation du siRNA, la taille et le potentiel zêta.

Après leur incubation en présence de nucléases, aucune des trois formulations ne présente de dégradation du siRNA ; celui étant protégé efficacement à l'intérieur du polyplexe.

Différentes techniques ont ensuite été utilisées pour évaluer le comportement des polyplexes en présence de sérum. Tout d'abord, l'interaction des polyplexes avec l'albumine, utilisée comme protéine modèle, a été caractérisée par titration calorimétrique isotherme (ITC pour *Isothermal Titration Calorimetry*). Cette technique a montré une interaction limitée entre l'albumine et les 3 types de polyplexes. Une interaction légèrement plus faible pour les P-G-M-PEG₂₀₀₀ a été mise en évidence.

Après 1 heure en présence de 50 % de sérum, environ 50 % du siRNA sont relargués des polyplexes, et ce pour les trois formulations (P-G-M et P-G-M-PEG). Au-delà de 1 heure, la quantité de siRNA encapsulée reste cependant stable. Dans le sérum (10 %), la taille des polyplexes P-G-M augmente progressivement en fonction du temps. Pour les polyplexes PEGylés, la taille mesurée dans le sérum après 1 heure est plus importante que celle mesurée dans le tampon. Cependant, celle-ci n'évolue pas au cours du temps.

Les tests de cytotoxicité sur des cellules endothéliales et les tests d'hémocompatibilité (hémolyse, agrégation plaquettaire, activité de thrombine) n'ont montré aucun effet des trois formulations sur la fonction sanguine.

Les polyplexes ont alors été testés dans un modèle de xénogreffe tumorale chez la souris. Après l'injection dans la veine de la queue, les polyplexes P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀ s'accumulent rapidement (4 heures post-injection) au niveau de la tumeur probablement par ciblage passif (effet EPR), mais aussi au niveau d'autres organes comme le foie et la rate. Cependant, seuls les polyplexes P-G-M montrent une accumulation importante au niveau pulmonaire.

Afin d'avoir une idée sur leur capacité d'endocytose dans des conditions proches des milieux physiologiques, la capacité des polyplexes à entrer dans les cellules a été déterminée en présence de sérum *in vitro*. L'ajout de sérum provoque une diminution drastique de l'entrée cellulaire, encore plus importante pour les polyplexes PEGylés que pour les polyplexes non PEGylés (P-G-M).

Finalement, les trois formulations ont été testées d'une part quant à leur efficacité à dégrader l'ARNm HDAC5 et d'autre part quant à leur capacité à diminuer la prolifération cellulaire *in vitro* [15, 16]. Dans un milieu exempt de sérum, l'efficacité des polyplexes P-G-M après deux cycles de transfection est suffisante pour diminuer l'expression de la protéine HDAC5 et par conséquent, provoquer une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses (HCT116)

préalablement observée dans les cellules déplétées en HDAC5 [15]. Cependant l'ajout de PEG (P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀), diminue significativement l'efficacité de dégradation de l'ARNm codant pour HDAC5, qui devient alors insuffisante pour obtenir un effet antiprolifératif.

II.2. RÉSULTATS

II.2.1. PUBLICATION

PEGYLATED AND FUNCTIONALIZED ALIPHATIC POLYCARBONATE POLYPLEX MICELLES FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF HDAC5 SIRNA IN CANCER THERAPY

Antoine Frère^{a,c}, Alexandra Baroni^b, Elodie Hendrick^c, Anne-Sophie Delvigne^d, François Orange^e, Olivier Peulen^f, George R. Dakwar^g, Jérôme Diricq^b, Philippe Dubois^b, Brigitte Evrard^a, Katrien Remaut^g, Kevin Braeckmans^g, Stefaan C. De Smedt^g, Julie Laloy^d, Jean-Michel Dogné^d, Georges Feller^h, Laetitia Mespouille^b, Denis Mottet^{ct}, Géraldine Piel^{at}

^aLaboratory of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy (LTPB) – Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liege, Avenue Hippocrate 15 - 4000 Liege, Belgium

^bLaboratory of Polymeric and Composite Materials, Center of Innovation and Research in Materials and Polymers (CIRMAP), Research Institute for Health Sciences and Technology, University of Mons, Place du Parc 20 - 7000 Mons, Belgium

^cProtein Signalisation and Interaction (PSI) – GIGA, University of Liege, Avenue de l'Hôpital 11 - 4000 Liege, Belgium

^dNamur Nanosafety Center (NNC), Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), Department of Pharmacy, University of Namur, Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur, Belgium

^eCentre Commun de Microscopie Appliquée, University of Nice – Sophia Antipolis, Parc Valrose – 06108 Nice, France

^fMetastasis Research Laboratory (MRL) – GIGA, University of Liege, Avenue Hippocrate 15 - 4000 Liege, Belgium

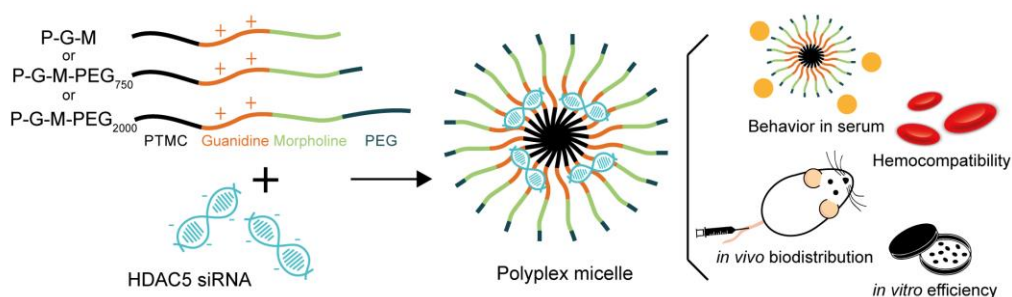
^gLaboratory for General Biochemistry and Physical Pharmacy, Ghent Research Group on Nanomedicines, Faculty of Pharmacy, Ghent University, Ottergemsesteenweg 460 - 9000 Ghent, Belgium.

^hLaboratory of Biochemistry, Centre for Protein Engineering (CIP), University of Liège, Allée du 6 Août 13 - 4000 Liège, Belgium.

[†]G. Piel and D. Mottet contributed equally to this work.

II.2.1.i. Abstract

Guanidine and morpholine functionalized aliphatic polycarbonate polymers able to efficiently deliver histone deacetylase 5 (HDAC5 siRNA into the cytoplasm of cancer cells *in vitro* leading to a decrease of cell proliferation were previously developed. To allow these biodegradable and biocompatible polyplex micelles to overcome the extracellular barriers and be effective *in vivo* after an intravenous injection, polyethylene glycol chains (PEG₇₅₀ or PEG₂₀₀₀) were grafted on the polymer structure. These nanoparticles, stable over time after freeze-drying, showed an average size of about 150 nm and a slightly positive zeta potential with complete siRNA complexation. In addition, behavior of PEGylated and non-PEGylated polyplexes were investigated in the presence of serum, in terms of siRNA complexation (Fluorescence Correlation Spectroscopy), size (Dynamic Light Scattering and Single-Particle Tracking), interaction with proteins (Isothermal Titration Calorimetry) and cellular uptake. Surprisingly, both PEGylated and non-PEGylated formulations presented relatively good behavior in the presence of fetal bovine serum (FBS). However, cellular uptake in protein-rich conditions showed that PEGylated polyplex micelles lost their ability to interact with biological membranes and enter into cells. Hemocompatibility tests showed no effect of these polyplexes on hemolysis and coagulation. *In vivo* biodistribution in mice was performed and showed siRNA accumulation at the tumor site for the three formulations. However, *in vitro* efficiency of PEGylated micelles decreases compared to non-PEGylated particles, leading to the loss of the antiproliferative effect on cancer cells, highlighting another demonstration of the “PEG dilemma”.



Keywords: siRNA; polyplex micelles; intravenous administration; aliphatic polycarbonate; polyethylene glycol; protein corona.

II.2.1.ii. Introduction

Since the discovery of RNA interference mechanism (RNAi) at the end of the last century [17], many researchers have tried to exploit its potential in the treatment of various human diseases, such as cancer [18, 19]. The administration of specific small interfering RNA (siRNA) into the cytoplasm leads to the degradation of complementary messenger RNA (mRNA), and therefore the shutdown of the target protein [20, 21]. However, the way into the cytoplasm is paved with extracellular and intracellular barriers. Naked siRNA exhibits a very short half-life in the bloodstream due to rapid degradation by serum nucleases. In addition, the high molecular weight and the negative charge also prevent the passage of siRNA through cell membranes. Vectors are thus required to transport and deliver siRNA into the cells. To obtain a therapeutic efficiency, these have to overcome numerous extracellular (nuclease degradation, plasma protein aggregation, recognition by the immune system, tumor accumulation, etc.) as well as intracellular barriers (endocytosis, endosomal escape, and siRNA release into the cytoplasm) [22-26].

In oncology, histone deacetylases (HDAC) family members are considered as a promising novel class of anti-cancer targets [27]. These HDAC are actually targeted by broad-spectrum pharmacological HDAC inhibitors (HDACi) [27]. These unselective HDACi show promising anti-tumoral activity both *in vitro* and *in vivo*. Based on their potent anti-cancer effects, they are currently being tested in various human clinical trials and some of them like Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat[®]), Romidepsin (Depsipeptide, FK228, Istodax[®]), Belinostat (PXD101, Beleodaq[®]), and Panobinostat (LBH589, Farydak[®]) were US FDA and/or EMA approved for the treatment of refractory or relapsed cutaneous T-cell lymphomas, validating the concept of HDAC inhibition to treat cancer patients [28-30]. Despite promising results in the treatment of hematological disorders, there is a need to improve the efficacy of these drugs in the clinic [31]. One way for such improvement is the development of more specific inhibitor directed against individual HDAC. By targeting one of the most relevant HDAC members critically involved in tumor progression, it may be possible to greatly improve the efficacy with the additional advantage of removing certain toxicities that may be associated with the inhibition of multiple HDAC [31]. The development of selective pharmacological HDAC inhibitors specifically targeting one HDAC member might be a difficult task, especially because these enzymes share a highly conserved catalytic domain [32]. A siRNA-based strategy might be therefore a better approach to selectively target relevant HDAC for cancer therapy. Preclinical investigations by targeted knockdown of HDAC demonstrated that HDAC5 silencing blocked cell

proliferation, cell survival and reduced tumor growth *in vivo* suggesting that selective inhibition of HDAC5 using siRNA could yield clinical benefit for cancer treatment [15, 16].

To deliver siRNA against HDAC5, we have previously developed new original aliphatic polycarbonate polymers [14, 33-36], grafted with guanidine and morpholine functional groups. The guanidine function, cationic at neutral pH, is necessary for both siRNA binding and interactions with the negatively charged plasma membranes [1, 2]. The morpholine function, weak base and ionizable in acidic pH, confers buffer capacity to the polymer and helps to escape from the endosome using the "proton sponge" effect [4]. In addition to these functionalized blocks, the polymer contains a hydrophobic chain of poly(trimethylene) carbonate (PTMC), bringing an amphiphilic character to the polymer, and thus allowing it to form micelles in aqueous solution [5-7]. As shown in our previous study [14], the combination of both morpholine and guanidine functionalities at a ratio above 1 with the presence of a hydrophobic group on the copolymer structure seems to be crucial to overcome intracellular barriers, ultimately leading to protein downregulation activity of siRNA polyplex micelles. Beyond the requested functions to achieve polyplex formation and transport, the aliphatic polycarbonate backbone is fully biocompatible and bioresorbable, making this family of polymer very promising for gene therapy as the vector is degraded after its task is achieved. Such fine-tuned synthetic polymer vector can be produced through a metal-free polymerization process involving nontoxic catalysts in mild conditions and giving access to any kind of functional polymers and topologies [37-39].

The objective of the present work is to further modify these polymers to enable them to overcome the extracellular barriers and induce biological activity *in vivo* following intravenous injection. Once intravenously injected, polyplexes will interact with different components of the bloodstream. Understanding the influence of the presence of serum on the stability of nanoparticles is crucial to reach a therapeutic efficiency. Indeed, the high amount of anionic serum proteins can interact and cover the surface of cationic nanovectors, forming a "protein corona" around the particle [40]. The formation of this corona changes the identity of the nanovectors. First, the negatively charged proteins can compete with the siRNA on the binding to the nanovectors, resulting in a premature release of the siRNA in the bloodstream, before reaching desired cells. Secondly, the protein corona can modify the size and the aggregation state, resulting in too large particles for an optimal accumulation at the tumor site through the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect [41, 42]. Also, the corona can change the surface properties of the nanoparticles, lowering the interaction with the plasma membrane and

thus the cellular uptake and endosomal escape, crucial steps for the polyplex efficiency. In addition, hemocompatibility is a major concern, to safe translation into the clinic, the injection of polyplexes should not cause hemolysis and should not disturb the normal functions of the blood system, like platelet activation and coagulation [43].

The most common strategy to overcome interaction with blood constituents is PEGylation of nanoparticles. The polyethylene glycol (PEG) shielding around the particle reduces the interaction with plasma proteins; depending on the coverage density, the conformation and the molecular weight of PEG chains [12]. Unfortunately, PEGylation may interfere with some crucial steps, a problem known as the "PEG dilemma" [44]. Indeed, PEGylation masks the positive surface charge of polyplexes, with a consequent reduction of the interaction of nanoparticles with the plasma proteins, but also with the cellular membranes, leading sometimes to a decrease in the biological effect.

Two types of PEG were grafted on the previously described polymer: PEG₇₅₀ and PEG₂₀₀₀. These two P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀ polymers were compared to the non-PEGylated polymer (P-G-M) used in our previous work, in terms of physico-chemical characteristics of polyplexes. The suitability of these micelles for IV injection was evaluated studying siRNA protection against nucleases, behavior in the presence of serum (understanding of nanoparticle-protein interaction, release of siRNA, size stability, and cellular uptake), cytotoxicity and hemocompatibility testing, and *in vivo* tumor accumulation in mouse model. Finally, the biological efficiency of these nanovectors was determined, in order to highlight a decrease of proliferation of cancer cells.

II.2.1.iii. Materials and Methods

a. Materials

HDAC5 siRNA (sense strand: 5'-CAG-CAU-GAC-CAC-CUG-ACA-ATT-3'; antisense strand: 5'-UUG-UCA-GGU-GGU-CAU-GCU-GTT-3'), GL3 siRNA (sense strand: 5'-CUU-ACG-CUG-AGU-ACU-UCG-ATT-3'; antisense strand: 5'-UCG-AAG-UAC-UCA-GCG-UAA-GTT-3') and Alexa Fluor[®] 546, 647 and 660 labeled siRNAs were provided by Eurogentec (Seraing, Belgium). Nuclease-Free Water was purchased from Ambion (Life Technologies, Gent, Belgium). 20X TE (Tris-EDTA, pH 7.5) buffer was obtained from Invitrogen (Life Technologies, Gent, Belgium). Mannitol was purchased from Certa (Braine-l'Alleud, Belgium). Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (200 USP units/mg), and ethidium bromide solution (BET) were provided by Sigma-Aldrich (Diegem, Belgium). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Gibco (Life Technologies, Gent, Belgium).

b. Typical procedure for the organocatalytic ROP of cyclic carbonates in the synthesis of aliphatic polycarbonate copolymers

In a glovebox, a glass vial was charged with the (macro)initiator (BzOH for *P-G-M*, PEO₇₅₀ and PEO₂₀₀₀ for *P-G-M-PEG*₇₅₀ and *P-G-M-PEG*₂₀₀₀, respectively), the catalyst (DBU) and methylene chloride. The solution was maintained under magnetic stirring until homogeneity was reached. Then, the first monomer (TMC for *P-G-M*, CM for *P-G-M-PEG*₇₅₀ and *P-G-M-PEG*₂₀₀₀) dissolved in methylene chloride was one-shot added to give a final monomer concentration of 1 M. The initial molar ratio of initiator to catalyst used for each synthesis was 1:5 (ROH:DBU). The vial was sealed and maintained under vigorous stirring until a monomer conversion higher than 90 % was reached (as observed by SEC). Polymer chains were directly extended by subsequent addition of the second (Boc-CG) and the third (CM for *P-G-M*, TMC for *P-G-M-PEG*₇₅₀ and *P-G-M-PEG*₂₀₀₀) monomers, dissolved in a minimum of DCM, as soon as the previous monomer conversion has reached 90% (as observed by SEC). Polymerizations were quenched with a dash of Amberlyst[®] 15-H and the polymers were recovered after dropwise precipitation in cold n-heptane under vigorous stirring. The resulting copolymers were dried overnight under reduced pressure at room temperature. The polymer samples were characterized by SEC in THF + 2 wt % NEt₃ and ¹H-NMR in CDCl₃ to determine the macromolecular parameters [14]. The Boc protecting groups of the guanidinium moieties were eliminated using TFA in a 5 mL stirred solution of DCM/TFA 4/1 v/v for 18 hours at room temperature. Volatiles were removed *in*

vacuo and the polymers were dried overnight under reduced pressure at room temperature. Samples were stored into a desiccator maintained under vacuum to avoid moisture entrapment and potential hydrolysis.

Table 1. Characterization of guanidine and morpholine based aliphatic polycarbonates obtained by organocatalytic ROP of functional cyclic carbonates (DCM, r.t., $[M]_0 = 1M$).

Abbreviation	Sample	DP ^a		Mn ^b (g.mol ⁻¹)	Đ ^c	N _g ^d	N _m ^d	N _m /N _g
		CG	CM					
P-G-M	Bz-PTMC ₃₇ - <i>b</i> -PCG ₈ - <i>b</i> -PCM _{8,5}	8	8.5	10100	1.4	0.79	0.84	1.1
P-G-M-PEG₇₅₀	PEO ₇₅₀ -PCM _{9,5} - <i>b</i> -PCG ₈ - <i>b</i> -PTMC ₅₁	8	9.5	12300	2.2	0.65	0.78	1.2
P-G-M-PEG₂₀₀₀	PEO ₂₀₀₀ -PCM ₁₆ - <i>b</i> -PCG _{10,5} - <i>b</i> -PTMC ₆₃	10.5	16	17700	2.2	0.60	0.90	1.5

^aAs obtained by ¹H NMR spectroscopy (500 MHz) in CDCl₃ at r.t.

^bAs calculated by ¹H NMR spectroscopy (500 MHz) after BOC deprotection.

^cAs obtained by SEC in THF + NEt₃ (2 w%) at 35°C before BOC deprotection.

^dConcentration of nitrogen atoms present in the polymer structure (N value), given by guanidinium functions (N_g) or morpholine functions (N_m).

c. Polyplexes formation

Polyplexes were prepared by electrostatic interaction of the cationic copolymers with the negatively charged siRNA according to the N/P ratio, as described previously [14].

d. Size, zeta potential and siRNA complexation

Size and surface charge (zeta potential) of polyplexes were determined at 100 nM of siRNA using the Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments, UK). The complexation rate of siRNA was determined by the Quant-iT[™] RiboGreen[®] RNA reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Life Technologies, Gent, Belgium).

e. Transmission Electron Microscopy (TEM)

For TEM characterization, nanoparticles were negatively stained using the following procedure: a drop of nanoparticles suspension (5 μL, 300 nM siRNA final concentration) was placed on a glow discharged 300 mesh copper grid with a carbon support film for 3 minutes, and the excess solution was then removed with a filter paper. Staining was performed by adding a drop of 1% uranyl acetate aqueous solution (w/v) on the grid for 2 minutes and then removing the excess

solution. TEM observations were performed with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope, equipped with a Morada camera, at a 100 kV acceleration voltage.

f. Nuclease resistance

The protection of siRNA against nucleases when inside polyplexes was evaluated by gel retardation assay. 30 μL of 500 nM polyplexes were incubated with or without 1 μL of RNase A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Roche, Basel, Switzerland) for 1 hour. Then, 0.5 μL of RNaseOUT (Invitrogen, Life Technologies, Gent, Belgium) for RNase A inactivation and 18.5 μL of heparin (2 mg/mL , Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium) for siRNA release were added. 40 μL of these samples mixed with 2 μL of glycerol and 2 μL of gel blue loading were loaded onto a 4% agarose gel in TAE buffer containing 0.01% ethidium bromide. Electrophoresis was performed at 100 V for 1 hour in a Horizon 11.14 horizontal gel electrophoresis apparatus (Biometra, Goettingen, Germany). The gel was visualized by exposure to UV-illumination by a Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, USA). Controls are 300 nM siRNA, 300 nM siRNA + 1 μL of RNase A, and 300 nM siRNA + 0.5 μL of RNaseOUT + 1 μL of RNase A.

g. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Interaction of polyplexes with Bovine Serum Albumin (BSA) was evaluated using ITC [45]. ITC titrations were performed on a MicroCal ITC200 (GE-Malvern Instruments, UK) equipped with a 200 μL Hastelloy sample cell and an automated 40 μL glass syringe rotating at 1000 rpm. In order to avoid buffer mismatch and the generation of dilution heats, 5 mM BSA (Sigma A7030, fatty acid-, protease- and globulin-free) were first dialyzed overnight at 4°C against 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5 in RNase free water. Then, the dialysis buffer was used to prepare the nanoparticles. Control experiments indicated negligible heat signals for buffer injections into nanoparticles and dilution heats of BSA injections into buffer were subtracted from experimental data. In a standard experiment, nanoparticles formed by 11.12 μM polymer were titrated by 9 injections (4 μL) of 5 mM BSA at an interval of 150 s.

The obtained data were fitted via nonlinear least squares minimization method to determine binding stoichiometry (n), association constant (K_a), and change in enthalpy of binding (ΔH_b°) using ORIGIN 7 software v.7 (OriginLab). The Gibbs free energy of binding, ΔG_b° , was calculated from K_a and the entropic term, $T\Delta S_b^\circ$, was derived from the Gibbs-Helmholtz equation using a fixed ΔH_b° value.

h. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) was employed to determine the siRNA complexation stability in the presence of fetal bovine serum (FBS). FCS is a microscopy-based technique able to monitor the fluorescence intensity fluctuations of fluorescent siRNA diffusing in and out of the focal volume of a confocal microscope, enabling the determination of the percentage of complexed siRNA [46]. FCS measurements were performed on polyplex micelles containing Alexa Fluor® 647 labeled siRNA. 5 μ L of 300 nM polyplexes dispersion were supplemented with TE buffer and FBS to reach a final volume of 50 μ L, containing 10 or 50% FBS (v/v). Samples were analyzed before FBS addition and after 1, 2, and 3 hours incubation at 37°C following the experimental setup described previously [47].

i. Fluorescence Single-Particle Tracking (fSPT)

Size stability of polyplexes in the presence of FBS was observed by Fluorescence Single-Particle Tracking (fSPT), a microscopy-based technique designed to observe the motion of individual fluorescent nanoparticles in solution. The fluorescent nature of siRNA in polyplex micelles makes them visible in complex media, like FBS. According to the Brownian motion, size distribution can be deduced from the mobility of the sample [48]. fSPT measurements were performed on the same samples used in FCS, after 1 and 3 hours incubation at 37°C following the experimental setup described previously [47].

j. Cell culture (HUVEC, HeLa and HCT116)

HUVEC primary cells (human umbilical vein endothelial cells) were provided by Lonza (CC-2519, Verviers, Belgium) and cultured in EGM basal medium (Lonza). HeLa cancer cells (human cervical carcinoma cell line) were obtained from Pr. Marc Thiry (GIGA-Neurosciences, University of Liege, Belgium) and cultured at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, Life Technologies, Gent, Belgium). HCT116 cancer cells (human colorectal carcinoma cell line) were provided by Pr. Eric Verdin (Gladstone Institute, University of California, USA) and cultured in McCoy's 5A (Lonza) supplemented with 10% heat inactivated FBS.

k. Cellular uptake in the presence of serum (FBS)

Alexa Fluor® 546 labeled siRNA fluorescent polyplexes were formed at a concentration of 600 nM and then diluted to 100 nM in Opti-MEM® (Invitrogen, Gent, Belgium) and FBS to reach a final concentration of 0, 10, 30, or 50 % FBS (v/v). These samples were preincubated 1 hour at 37°C and then added to HeLa cells for 3 hours. Cells were washed with PBS, trypsinized and collected into complete DMEM medium. Samples were centrifuged 4 minutes at 250 g at room temperature and suspended in 350 µL D-PBS. 10^4 cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, FACSCalibur, USA). Data were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences, USA).

l. Cell viability (MTS) and cytotoxicity (LDH) assays

HUVEC were seeded in a 96-well plate at a density of $8 \cdot 10^4$ cells/well and incubated for 48 hours. Polyplex micelles, at a concentration of 100 nM GL3 siRNA, were added to the cells in 100 µL of Opti-MEM® and incubated for 3 hours and then washed. Cell viability and cytotoxicity of polyplex micelles were determined 24 hours later using MTS assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, WI, USA) or LDH assay (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}, Roche, Basel, Switzerland), according to manufacturers' instructions.

m. Hemocompatibility assays

Hemolysis, platelet aggregation and coagulation (calibrated thrombin generation test) were tested using protocols described previously [43] and using a final concentration of polyplex micelles of 100 nM GL3 siRNA.

n. *In vivo* biodistribution in mice

All procedures for xenograft tumor mouse model were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Liège (approval #1748). $3 \cdot 10^6$ HeLa cells in 200 µL PBS were subcutaneously injected into the right flank of 8 weeks-old male NOD-SCID mice (Charles River, MA, USA). Four weeks after inoculation, when the tumor size reached $\sim 500 \text{ mm}^3$, a single dose of polyplexes containing 1 mg/kg Alexa Fluor® 660 siRNA at N/P 40 (100 µL) were injected into the tail vein. Four hours post-injection, mice were anesthetized with isoflurane and images of the full animal fluorescence were recorded by Xenogen IVIS-200 System (PerkinElmer, MA,

USA) using Cy5.5 filters. Mice were then sacrificed and fluorescence intensity of their organs was examined *ex vivo*.

o. mRNA expression

mRNA expression was determined on HeLa cells 48 hours after transfection, using quantitative real-time PCR. Protocol is detailed in our previous publication [14]. In the case of a second treatment, transfection was repeated after 24 hours and cells were incubated for the last 24 hours.

p. Proliferation assay

$4 \cdot 10^4$ transfected HCT116 cells were seeded in 24-well tissue culture plates in complete medium and were harvested at the indicated time-points. The cell numbers were indirectly determined using Hoechst incorporation (Bisbenzimidazole H33258, Calbiochem, Merck, Nottingham, UK), as previously described [49].

q. Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate ($n=3$), unless otherwise stated. Values are given as means \pm standard deviation (SD). Statistical tests used are described in legends of related figures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ were considered statistically significant.

II.2.1.iv. Results and Discussion

a. Polyplexes characterization and siRNA complexation

Formation of polyplexes is due to electrostatic interaction between cationic functional groups present on the polymer structure with anionic phosphate function of the siRNA. Size, zeta potential and complexation of siRNA are closely related to the N/P ratio. To select the optimal N/P ratio, particles were characterized in buffer from N/P 10 to N/P 60, at a fixed siRNA concentration of 100 nM (**Fig. S1**). With the addition of polymer, the complexation of siRNA increases to reach more than 95%. The size stabilizes around 200 nm and the zeta potential reaches a plateau at slightly positive values. For P-G-M-PEG₂₀₀₀, size versus N/P ratio profile is different from classical profile for unexplained reasons. However, the optimal N/P ratio was chosen based on the surface charge and the siRNA complexation. For the three polyplex micelles, N/P ratio of 40 was chosen for next experiments.

Table 2. Physicochemical characteristics of polyplex micelles at N/P 40. Values represent mean \pm SD (n=3).

Polyplex micelle	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	Complexed siRNA (%)
P-G-M	223 \pm 18	0.24 \pm 0.05	11.2 \pm 0.9	100.4 \pm 0.4
P-G-M-PEG ₇₅₀	151 \pm 20	0.22 \pm 0.02	8.2 \pm 1.1	97.8 \pm 0.6
P-G-M-PEG ₂₀₀₀	150 \pm 25	0.34 \pm 0.08	5.0 \pm 0.9	100.0 \pm 0.1

Physicochemical characteristics at N/P 40 are detailed in **Table 2**. PEGylated and non-PEGylated polyplexes show similar siRNA complexation capacities. The hydrodynamic diameter was slightly higher for the non-PEGylated polymer (P-G-M). Polydispersity Index (PDI) was below 0.3 for P-G-M and P-G-M-PEG₇₅₀, indicating nearly monodisperse sample. P-G-M-PEG₂₀₀₀, with a PDI of 0.34, presents a higher but moderate polydispersity. In terms of surface charge, the presence of the PEG chains influences the zeta potential, decreasing proportionally based on the length of the chain. These charge decrease was predictable because of the masking of the positive surface charge by PEGylation.

Morphology of these nanoparticles was determined by transmission electron microscopy (TEM). TEM images at different magnifications (**Fig. 1**) show the spherical morphology of polyplex micelles. Unlike the PEGylated particles, P-G-M polyplexes have a tendency to form aggregates, because of too low electrostatic and steric repulsions between these nanoparticles. The three samples show a smaller size with TEM, around 100 nm, than values measured by DLS (**Table 2**). This is due to the fact that DLS determines the hydrodynamic diameter of samples in the aqueous buffer, while TEM measure size of particles in the dry state.

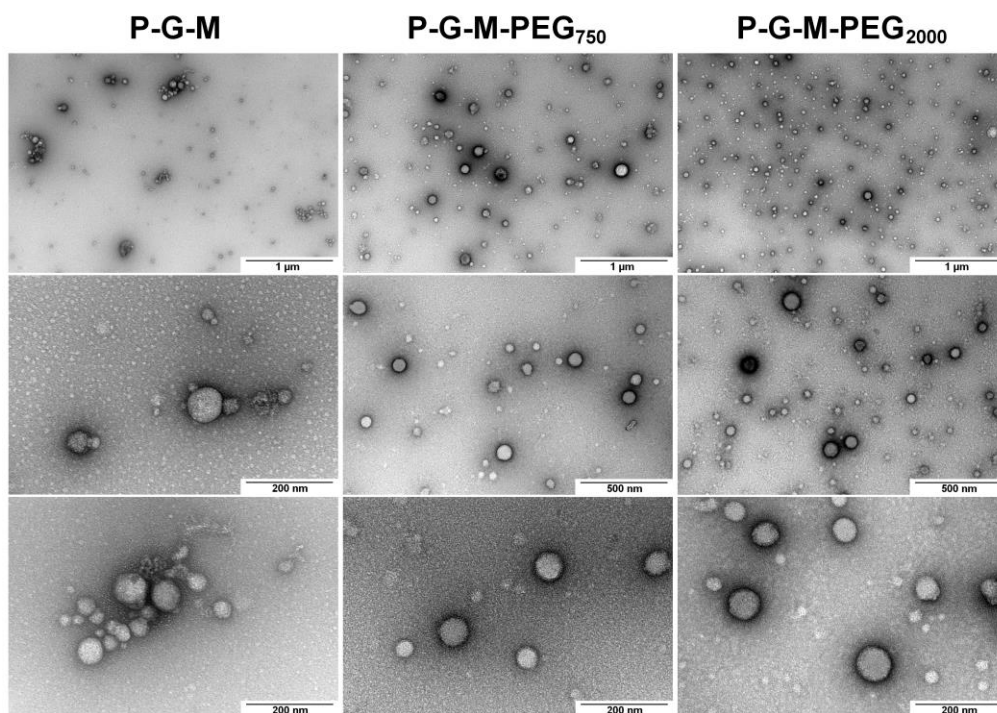


Fig. 1. TEM images of P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes at different magnifications.

b. Nuclease resistance

As explained in the introduction, siRNA should be protected from nucleases degradation when complexed into polyplexes micelles. To verify the ability of polymers to protect siRNA from nucleases, gel retardation assay was performed after incubation with RNase A for 1 hour, followed by its inhibition by RNase OUT, and the release of siRNA with heparin. **Fig. 2** shows that the siRNA is protected when complexed in both PEGylated (**Fig. 2B**) and non-PEGylated

(Fig. 2A) polyplex micelles compared to naked control siRNA, which is immediately fully degraded.

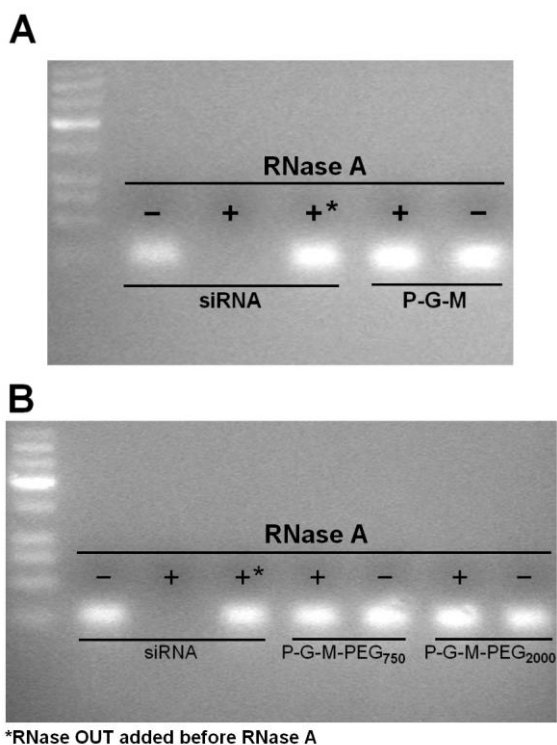


Fig. 2. Nuclease resistance of siRNA complexed in polyplex micelles. Gel retardation assay was performed after incubation with RNase A for 1 hour, followed by its inhibition by RNase OUT, and the release of siRNA with heparin. (**A**: P-G-M; **B**: P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀.)

c. Polyplexes behavior in the presence of FBS

Behavior of PEGylated and non-PEGylated micelles in the presence of serum was evaluated using different techniques. First, interaction of polyplex micelles with BSA was evaluated using ITC. Then, the effect of PEG₇₅₀ and PEG₂₀₀₀ grafted polymers on behavior in the presence of FBS was evaluated in terms of siRNA release (FCS), aggregation (fSPT) and cellular uptake (flow cytometry), compared to non-PEGylated polyplexes.

Interaction of polyplexes with BSA

In order to study the interactions of the investigated nanoparticles with serum proteins, micelles were titrated with BSA, a blood model protein, using ITC. This system records the heat generated by the association of the binder with its ligand and following progressive saturation, the binding enthalpy, the affinity constant and the stoichiometry are usually derived by fitting of a Wiseman plot (**Fig. 3**). Titration of the investigated nanoparticles with BSA was found to be a low affinity system, with dissociation constants in the mM range. For such low affinity systems, full saturation by the ligand cannot be reached because of technical limitations, in our case the solubility limit of BSA in the titration syringe. Accordingly, only a partial binding isotherm is recorded (**Fig. 3**) and one of the fitted variables has to be kept constant [50]. In previous studies, stoichiometry was invariably the fixed variable as this parameter can be confidently obtained from known chemical or macromolecular structures. This is obviously not valid for nanoparticles that can bind an unknown number of protein molecules. However, the binding enthalpies are generally in the range of 5 kcal/mol and this value was kept constant for a comparative analysis. Accordingly, the reported data should be regarded as apparent values. As indicated in **Table 3**, the BSA binding ability of the three types of nanoparticles does not differ significantly, although P-G-M-PEG₂₀₀₀ displays a slightly lower affinity constant K_a for the serum protein. All particles roughly bind a tenfold molar excess of BSA (n) with respect with polymer concentration. The enthalpic and entropic contributions to ΔG^o_b suggest that the association is enthalpy-driven (favorable interactions such as H-bonds or van de Waals contacts) whereas the weak and unfavorable entropy may reflect a reduction of the degree of freedom upon BSA binding. This weak and unfavorable entropic term also suggests that the hydrophobic effect is not significantly involved in BSA binding [51]. According to these results, we can conclude that the three polyplex formulations cannot be clearly distinguished regarding their binding properties with BSA. Only PEG₂₀₀₀ statistically reduces the affinity between particles and BSA compared to non-PEGylated particles. However, all the values are low and the observed difference should not be significant *in vivo*.

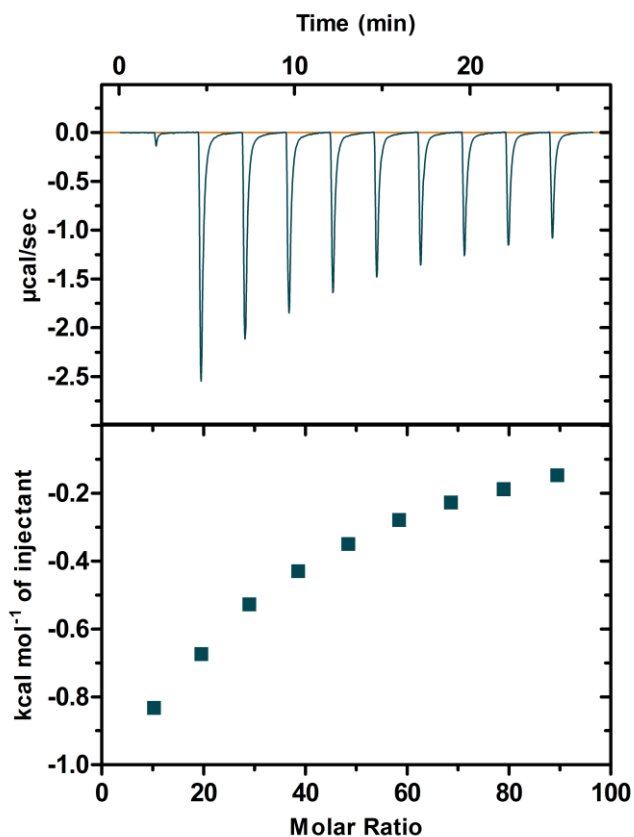


Fig. 3. Isothermal titration calorimetry of BSA binding to polyplex micelles P-G-M-PEG₂₀₀₀ at 25 °C. Upper panel: exothermic microcalorimetric traces of BSA (5 mM) injections into nanoparticle solution (11 μM). Lower panel: Wiseman plot of heat releases versus molar ratio of injectant/polymer in the cell.

Table 3. Binding parameters of BSA association with nanoparticles at 25 °C

Polyplex micelle	n	K_a (10^3 M^{-1})	ΔG_b° (kcal mol^{-1})	$\Delta H_b^{\circ(a)}$ (kcal mol^{-1})	$T\Delta S_b^\circ$ (kcal mol^{-1})
P-G-M	9.7 ± 0.3	2.1 ± 0.1	-4.5	-5.0	-0.5
P-G-M-PEG ₇₅₀	9.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	-4.6	-5.0	-0.4
P-G-M-PEG ₂₀₀₀	12.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1	-4.4	-5.0	-0.6

^(a)Fixed value for nonlinear fit of the binding isotherm for n equivalent binding sites

siRNA release in the presence of FBS

The siRNA release was determined using FCS before and after 1, 2, and 3 hours of incubation with 10% or 50% FBS (v/v). **Fig. 4** shows the percentage of complexed siRNA over time, in 10% **(A)** or 50% FBS **(B)**. In the presence of 10% FBS, the release of siRNA is low, especially for non-PEGylated polyplexes (P-G-M). After 3 hours, 13%, 31% and 35% of siRNA are released from P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀, and P-G-M-PEG₂₀₀₀, respectively. These results can be explained by a stronger electrostatic interaction between the positively charged polymer and negatively charged siRNA for P-G-M polyplexes. Indeed, the presence of PEG groups grafted on the polymer may hamper the formation of electrostatic interactions with the siRNA. The FCS results show a higher release of siRNA in 10% FBS for the PEGylated micelles. As explained in the introduction, the negatively charged proteins of the FBS compete with the siRNA complexation. At low FBS concentrations, the competition highlights the difference of affinity between polymers and siRNA. PEGylated polyplexes have a lesser affinity for the siRNA that is more rapidly released even in the presence of low concentrations of FBS. In the presence of 50% FBS, around 50% siRNA is released from both PEGylated and non-PEGylated formulations, due to the presence of a high amount of negatively charged proteins, which strongly compete with siRNA on the binding to the polymer. At high FBS concentration, the competition is saturated and no difference can be seen between formulations. As the competition phenomenon is saturated, the complexation rate remains constant up to 3 hours.

The fact that 50% of the siRNA remains associated with the polymer following 3 hours of incubation in protein-rich environment, indicates that are relatively stable in terms of cargo release [47, 52, 53].

Size distribution in the presence of FBS

The size distribution and aggregation profile of the studied formulations was obtained by fSPT, a powerful technique to follow the size of fluorescent nanoparticles in a protein-rich medium, like FBS. The great advantage of this method compared to DLS is the possibility to detect only fluorescent nanoparticles, not taking into account all other components of biological fluids (e.g. proteins, enzymes, etc.), whereas DLS is best suited for aqueous solutions. Size distributions in TE buffer, and after 1 or 3 hours incubation with 10% FBS were compared. In TE buffer, the average diameter of P-G-M polyplexes (**Fig. 4C**) was around 220 nm. One hour after FBS incubation, the size distribution became bimodal, with a peak around 111 nm and the second peak around 450 nm. After 3 hours, the intensity of the 450 nm peak increased while the 111

nm peak decrease, showing an increase in size of the polyplexes over time. For P-G-M-PEG₇₅₀ particles (**Fig. 4D**), the average size in buffer was 135 nm, increasing to 275 nm after 1 hour of incubation with FBS. Between 1 and 3 hours, the size remains constant, showing a relative stability over time, but an initial increase of size in the presence of FBS. Finally, P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes (**Fig. 4E**) showed a size around 260 nm in buffer. However, the behavior in the presence of FBS is similar to P-G-M-PEG₇₅₀ polyplexes, with an initial increase of the size becoming stable after 1 hour (around 510 nm). These size distributions were also evaluated by DLS (**Fig. S3-S4**). DLS results show that the size increase is greater for non-PEGylated polyplexes, with a diameter around 600-700 nm. The size of P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀ is located around 300 nm directly after FBS addition, increasing slightly and stabilizing close to 400 nm, from 1 to 3 hours. Unfortunately, it was not possible to record size distribution in 50% FBS due to the 50% release of siRNA, making the dispersion medium too fluorescent to clearly distinguish diffusing nanoparticles.

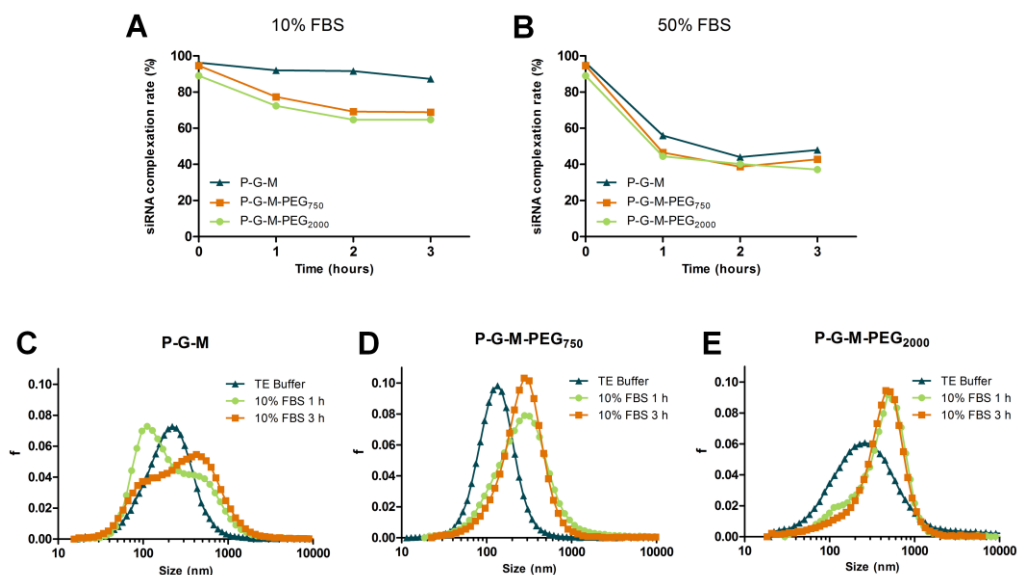


Fig. 4. siRNA complexation rate and size evolution in the presence of FBS. siRNA complexation rate of the three different polyplexes determined by FCS, in TE buffer (time = 0) and following 1 hour, 2 hours, and 3 hours incubation at 37°C with 10% (**A**) or 50% FBS (**B**). Size distributions determined by fSPT, in TE buffer and following 1 hour and 3 hours incubation in 10% FBS at 37°C, for P-G-M (**C**), P-G-M-PEG₇₅₀ (**D**), and P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes (**E**). The Y-axis refers to the fraction (f) of polyplexes that appear with the corresponding size on the X-axis.

According to these fSPT and DLS results, PEGylation appears to have a role in the increase of stability of the particle size over time in the presence of FBS, preventing their aggregation. The

size of P-G-M polyplexes increases over time in the presence of FBS. However despite this aggregation, a major population of polyplexes remains in a size range compatible with intravenous administration.

Influence of FBS on cellular uptake of polyplexes micelles

To evaluate the effect of the presence of high amount of proteins in the medium on the cellular uptake, flow cytometry was performed after preincubation of polyplexes in medium supplemented with 0, 10, 30, or 50% FBS. The Mean Fluorescent Intensity (MFI) of HeLa cells was evaluated 3 hours after transfection, indicating the mean amount of fluorescent siRNA uptaken by cells (**Fig. 5**).

In serum-free conditions (Opti-MEM[®]), P-G-M and P-G-M-PEG₇₅₀ micelles present a significantly better uptake than P-G-M-PEG₂₀₀₀. These results show that PEG₂₀₀₀ chains decrease cellular uptake in serum-free condition probably because of weaker interaction with cells due to large PEG chain.

After 1 hour of preincubation in 10% FBS, the cellular uptake is decreased, excepted for P-G-M-PEG₂₀₀₀ that shows a slighter decrease. The cellular uptake of these micelles is not significantly different as in serum-free conditions, contrary to P-G-M and P-G-M-PEG₇₅₀. The decreased uptake observed for these micelles can partially be explained by an increase of the size observed in 10% FBS by FCS and DLS (**Fig. 4 and S3**). However, a decrease of the cellular uptake was also expected for P-G-M-PEG₂₀₀₀ micelles. The reason for the decrease in the uptake is not clear in this case.

With 30% and 50 % FBS, the decreased uptake is even more pronounced for the PEGylated micelles, with a MFI close to 0 compared to non-PEGylated polyplexes. Clearly, P-G-M polyplexes cell uptake is less influenced by the presence of high amounts of FBS. The decrease in cellular uptake can generally be explained by (i) a premature release of siRNA from micelles in the presence of FBS, (ii) an increase of the size that can interfere with endocytosis mechanism and/or (iii) the formation of a protein corona on the surface of polyplexes that can modify the surface properties of nanoparticles and their ability to interact with plasma membranes [54-56]. In the case of PEGylated and non-PEGylated P-G-M micelles, the uptake differences cannot be explained only by a different release of siRNA. Indeed, **Fig. 4B** shows that the release in 50% FBS after one hour is similar for both micelles. Differences in the protein-corona composition can also explain different uptake of PEGylated and non-PEGylated

micelles in concentrated FBS medium. Anyhow, these data suggest that such a reduction in cellular entry might be associated with a reduced efficiency compared to serum-free *in vitro* conditions.

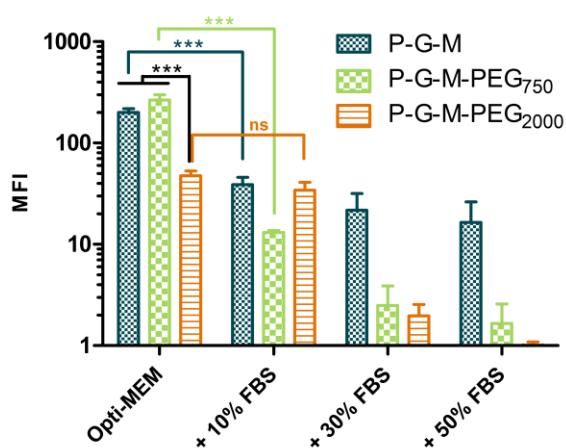


Fig. 5. Cellular uptake in serum-free medium and in the presence of different concentrations of FBS. Mean Fluorescence Intensity (MFI) of HeLa cells treated with polyplexes micelles containing fluorescent siRNA, after 1 hour of incubation in Opti-MEM[®] containing 0, 10, 30 or 50 % FBS at 37°C. MFI is normalized to untreated control cells. Statistical analysis was performed by using two-way ANOVA, followed by a Bonferroni's test.

d. Toxicity on endothelial cells (HUVEC)

After intravenous injection, endothelial cells are the first cells that are in contact with polyplex micelles. The toxicity of polyplexes on primary human endothelial cells (HUVEC) was thus evaluated *in vitro* using MTS viability and LDH cytotoxicity assays. Cells were treated for 3 hours with 100 nM siRNA complexed with the three different polymers and cytotoxicity was measured 24 hours later. As shown in **Fig. 6**, both MTS and LDH assay demonstrate that the cytotoxicity of these polycarbonate polymers is low and non-significantly different from the negative control PBS, while a treatment with Triton X-100 (1%) used as positive control has a drastic effect. These data suggest that the intravenous injection of these formulations should therefore not affect the endothelium.

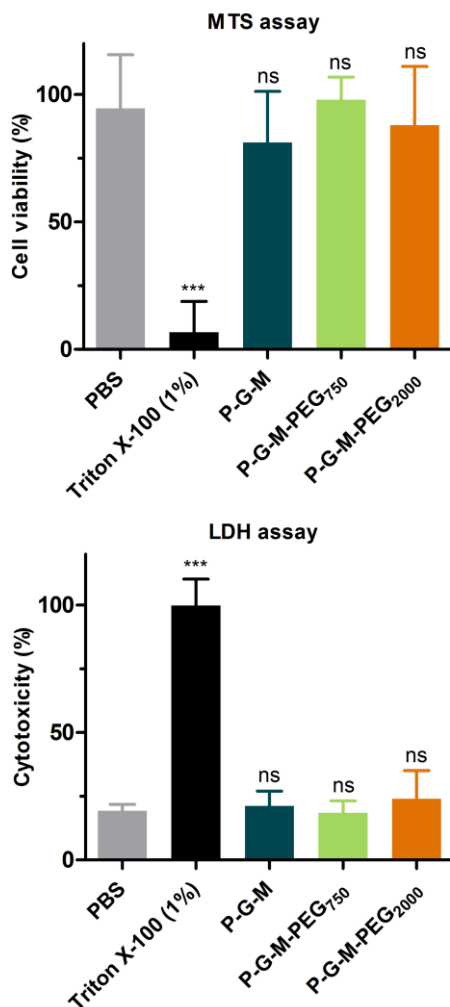


Fig. 6. Toxicity of polyplex micelles on primary endothelial cells. **(A)** Cell viability (MTS assay) of HUVEC cells treated for 3 hours with different micelles at a concentration of 100 nM in siRNA, washed and then cultured for additional 24 hours. The percentage is related to non-treated cells (100%), and blank wells without cells (0%). **(B)** Cytotoxicity (LDH assay) of HUVEC cells treated for 3 hours with different micelles at a concentration of 100 nM in siRNA, washed and then cultured for additional 24 hours. The percentage is related to positive control (Triton X-100 1%, cytotoxicity of 100%), and blank wells (without cells, cytotoxicity of 0%). Statistical comparison with negative control (PBS) was performed by using one-way ANOVA, followed by the Dunnett's test ($n=4$).

e. Hemocompatibility

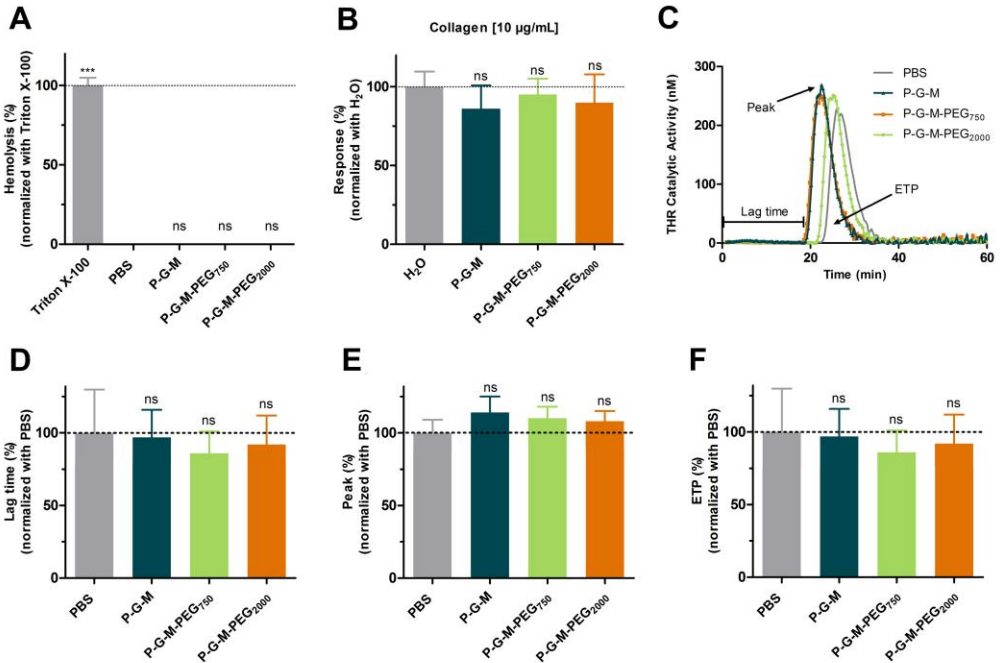


Fig. 7. Hemocompatibility assays of polyplex micelles, performed at a final concentration of siRNA of 100 nM. **(A)** Human RBC lysis (% of hemolysis) in whole blood after 1.5 hour incubation. Triton X-100 1% and PBS were respectively used as positive and negative controls. **(B)** Platelet aggregation induced by collagen in the presence of the different formulations. H₂O is used as negative control. Results are expressed as % of response, normalized with H₂O. **(C)** Representative thrombin activity profile induced by tissue factor in the presence of nanoparticles or PBS (negative control). Control parameters (lag time **(D)**, peak **(E)**, and ETP **(F)**) of these thrombin activity profiles were expressed as %, normalized with PBS values. Statistical comparisons with negative controls were performed by using one-way ANOVA, followed by the Dunnett's test.

To evaluate the compatibility of polyplex micelles formulation with an intravenous injection, hemocompatibility assays were performed. Results show that P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀, and P-G-M-PEG₂₀₀₀ micelles did not induce hemolysis in whole blood (**Fig. 7A**) and in washed RBC (**Fig. S5A**). These results have a high importance, since a release of hemoglobin can lead to adverse effects, like renal toxicity, anemia, and pulmonary hypertension [57]. Next, platelet aggregation was evaluated, after 1 hour incubation, in the presence of different polyplex micelles and different inducers (**Fig. 7B** for collagen, **Fig. S5B** for ADP and **S5C** for arachidonic acid). At the

investigated concentrations, P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀, and P-G-M-PEG₂₀₀₀ did not significantly affect platelet aggregation, regardless the inducer used. Finally, in order to evaluate their potential interferences on coagulation process, nanoparticle formulations were tested with calibrated thrombin generation test. **Fig. 7C** shows representative thrombin activity profile induced by tissue factor in the presence of polyplex micelles. From these profiles, control parameters (lag time (**7D**), peak (**7E**), and Endogenous Thrombin Potential (ETP) (**7F**)) were extracted, normalized and compared to negative control, PBS. No significant difference was observed, showing no pro- or anticoagulation activity. Considering that these polyplex micelles have no effect on both hemolysis and coagulation, their intravenous injection can be considered without alterations of normal blood function.

f. *In vivo* biodistribution on mice

The *in vivo* biodistribution of Alexa Fluor[®] 660 labeled siRNA delivered alone or complexed with P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀, or P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplex micelles was examined after intravenous (IV) administration. First, we followed the accumulation of polyplexes in living mice 4 hours and 24 hours post injection of 1 mg/kg fluorescent siRNA in P-G-M-PEG₇₅₀. **Fig. 8A** shows that the siRNA already accumulates at the tumor site 4 hours post IV injection. This fluorescence at the tumor site decreases but still remains after 24 hours. Experiments of *ex vivo* imaging on tumors and principal organs were therefore performed 4 hours post IV injection. **Fig. 8B** shows a tumor accumulation of Alexa Fluor[®] 660-siRNA only in mice treated with P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplex micelles. No siRNA was detected in the tumors when mice were untreated or treated with free siRNA. Fluorescent siRNA was detected in the liver in all conditions except untreated mice, as well as in kidneys and the spleen, but in a lower level. Surprisingly, P-G-M polyplexes show a high accumulation in lungs, probably caused by accumulation of aggregates in small pulmonary capillaries, in corroboration with fSPT and DLS data showing a small aggregation of P-G-M polyplexes. To better distinguish the difference between tumors, fluorescence of the same tumors but with a different fluorescence scale is shown on **Fig. 8C**. Fluorescence seems to be slightly lower in tumors treated with P-G-M. These *in vivo* results confirm those obtained *in vitro*, with a relatively close behavior for the PEGylated and non-PEGylated polyplex micelles in protein-rich conditions.

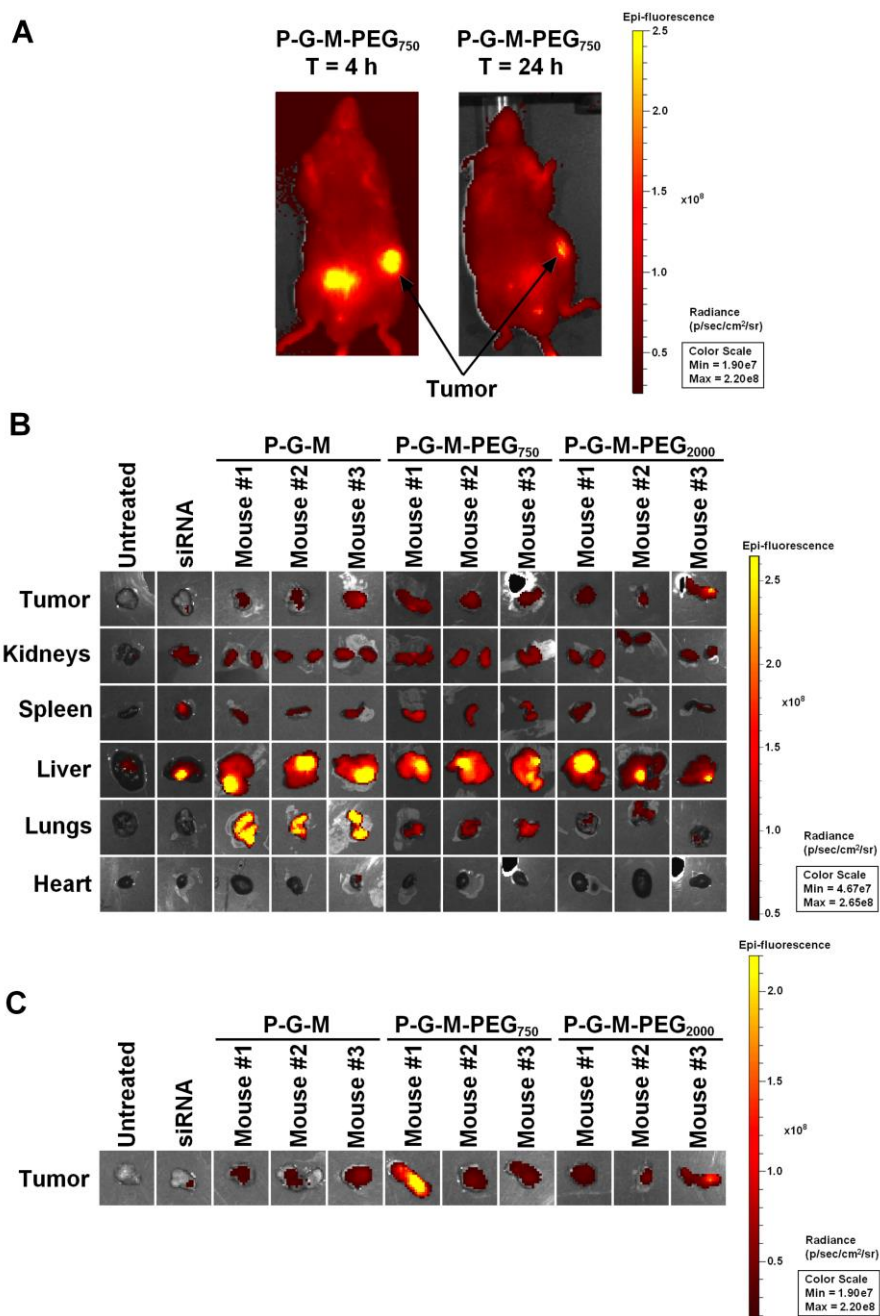


Fig. 8. *In vivo* biodistribution of Alexa Fluor® 660 labeled siRNA on mice. **(A)** Fluorescence intensity on living mice, 4 hours and 24 hours post-IV injection of 1 mg/kg fluorescent siRNA in P-G-M-PEG₇₅₀ micelles. **(B)** *Ex vivo* imaging on tumors and principal organs performed 4 hours post-IV injection of 1 mg/kg of free

siRNA, or complexed in P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ or P-G-M-PEG₂₀₀₀ micelles. **(C)** *Ex vivo* imaging on the same tumors but with a narrower fluorescence scale.

g. *In vitro* efficiency: mRNA, protein silencing, and biological activity

The ability of polyplexes to decrease the expression of HDAC5 mRNA was investigated by quantitative real-time RT-PCR, 48 hours after the treatment of HeLa cells in serum-free conditions. To exclude non-specific effects of polymers, the relative HDAC5 mRNA expression was normalized to cells treated with the same polyplexes but containing irrelevant GL3 siRNA. The mRNA shutdown was evaluated after 1 and 2 treatments with polyplexes. As shown in our previous publication, the P-G-M polyplexes were capable of decreasing the expression of HDAC5 (mRNA and protein) of about 50% after one treatment [14]. With a second dosing, efficiency was increased: the relative mRNA expression was reduced from 50% to 20% (**Fig. 9A**). To assess the biological relevance of HDAC5 depletion in cancer cells, a proliferation assay was performed on HCT116 human colorectal carcinoma cells. Cells were treated once (**Fig. 9B**) or twice (**Fig. 9C**) with P-G-M containing HDAC5 or control GL3 siRNA, then reseeded at equal densities and harvested at the indicated time-points. As shown in **Fig. 9B**, unique treatment with P-G-M polymers, leading to a 50% decrease in HDAC5 mRNA, is not sufficient to observe a significant effect. However, when cells are treated twice (**Fig. 9C**), mRNA shut-down leads to a significant decrease of cancer cells proliferation. These data might suggest that the relatively low level of siRNA after only one transfection is not sufficient to reduce the HDAC5 expression/activity beyond a critical threshold and consequently to inhibit cancer cell proliferation.

Contrarily, one treatment with PEGylated polymers is not enough to significantly reduce the expression of HDAC5 mRNA. A second treatment increased this efficiency, especially for P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes, with a relative expression of HDAC5 mRNA decreasing to 52% (**Fig. 9D**). Again, this decrease of HDAC5 mRNA expression of around 50% for two treatments of P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes is not sufficient enough to observe a significant decrease of cell proliferation (**Fig. 9E**), as observed in **Fig. 9B** for 1 treatment with P-G-M micelles.

It is well known that PEGylation can decrease the efficiency by decreasing cellular uptake and endosomal escape, in proportion to the chain length and density [58]. Here, the efficiency of P-G-M-PEG₂₀₀₀ is higher than P-G-M-PEG₇₅₀, despite the lower cellular uptake. A possible explanation to this observation is the difference of the morpholine/guanidine ratio of these two polymers. For P-G-M-PEG₂₀₀₀ polymer, the ratio is 1.5, compared to 1.2 for P-G-M-PEG₇₅₀

(Table 1). Previously, we showed that the buffer capacity of the polymer is directly related to this ratio [14], resulting in a possible higher endosomal escape for P-G-M-PEG₂₀₀₀ than P-G-M-PEG₇₅₀, counterbalancing the lowest cellular uptake. However, P-G-M and P-G-M-PEG₇₅₀ micelles show similar cellular uptake in serum-free conditions (**Fig. 5**) and similar buffer capacity (**Table 1**). Differences of efficiency between these two polyplex micelles are probably due to more complex intracellular mechanisms influenced by PEGylation.

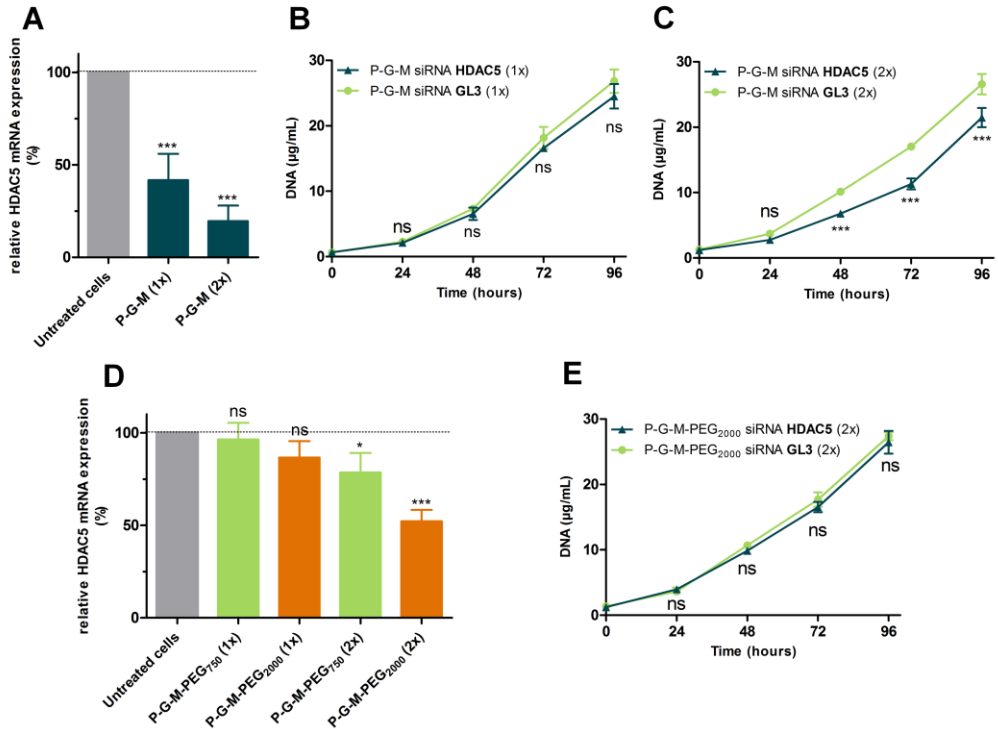


Fig. 9. *In vitro* efficiency of polyplex micelles. **(A)** Relative HDAC5 mRNA expression in HeLa cells determined by RT-qPCR 48 hours after the first transfection with P-G-M polyplexes, treated 1 or 2 times. Values were normalized to β -actin, and expressed relative to the value of irrelevant siRNA-transfected. Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA, followed by a Dunnett's test compared to control value of 100%. Proliferation assays on HCT116 cells after one **(B)** or two **(C)** treatments with P-G-M polyplexes. Statistical analysis was performed by using two-way ANOVA, followed by a Bonferroni's test. Only cells treated with P-G-M polyplexes showed a significant decrease in proliferation. **(D)** Relative HDAC5 mRNA expression in HeLa cells determined by RT-qPCR 48 hours after the first transfection with P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes, treated 1 or 2 times. **(E)** Proliferation assay on HCT116 cells after two treatments with P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes.

II.2.1.v. Conclusions

The objective of this work was to evaluate the ability of PEGylated and functionalized aliphatic polycarbonate polyplex micelles to administer intravenously HDAC5 siRNA to tumor cells, in order to decrease their proliferation. We compared newly synthesized P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀ polymers to non-PEGylated P-G-M polymer, for which *in vitro* efficiency has been shown previously [14]. Surprisingly, both PEGylated and non-PEGylated formulations presented relatively good behavior in the presence of FBS, in terms of siRNA release and size stability. Only a small aggregation phenomenon was observed for P-G-M micelles in the presence of FBS, while PEGylated seems to reduce this phenomenon. However, cellular uptake in protein-rich conditions showed that PEGylated polyplex micelles lost their ability to interact with plasma membrane and enter into cells, as already described for other nanoparticles [55, 56].

An *in vivo* study on mice by IV injection was performed and showed an accumulation of polyplex micelles at the tumor site thanks to the EPR effect, compared to naked siRNA. However, PEGylated polyplex micelles have a lower *in vitro* efficiency in the decrease of HDAC5 mRNA and protein expression, compared to non-PEGylated micelles, leading to the loss of the antiproliferative effect on cancer cells obtained for P-G-M micelles. This drawback of PEGylation is well known under the term of “PEG dilemma”.

To consider a future *in vivo* efficiency study, *in vitro* results should be reproduced in the presence of serum. However, according to *in vitro* efficiency and cellular uptake in the presence of FBS, *in vivo* efficacy of PEGylated polyplexes seems compromised. Contrariwise, non-PEGylated polyplex micelles seem to keep a part of their capacity to enter into cells in serum rich conditions and have good *in vitro* efficacy. In view of these results, non-PEGylated polyplex seem therefore more promising than PEGylated polyplex for *in vivo* efficacy. However, as shown by the *in vivo* study, these polymers appear to have a lesser accumulation in the tumor and a large unexplained accumulation in the lungs. Before considering *in vivo* efficacy using this polymer, it will be necessary to understand the reasons and the risks linked to this unexplained pulmonary accumulation. Other strategies than PEGylation should perhaps also be considered in order to form nanoparticles with stealth properties and low protein interaction combined with high cellular uptake and biological efficiency in the presence of biological fluids.

In the field of HDAC in cancer therapy, researchers and clinicians do believe that isotype-specific *HDAC inhibitors* will result in more effective drugs, leading to development of plenty new specific and selective pharmacological molecules by pharmaceutical company. HDAC5 is

emerging as a strong candidate for selective pharmacologic target inhibition in the oncology setting but some concerns exist about the ultimate goal of designing a pharmacological compound that selectively target this HDAC. Although a lot of work remains to be done to further improve the efficacy of our nanoparticles, HDAC inhibition-based cancer therapy might benefit from such delivery system to specifically target HDAC members soon.

II.2.1.vi. Acknowledgment

Authors thank the Belgium National Fund for Scientific Research (<http://www.frs-fnrs.be>), TELEVIE, the Centre Anti-Cancéreux and Fonds Léon Frédéricq près de l'Université de Liège for funding. The authors thank the animal facility, Fabrice Olivier, Marie Dehuy, Natacha Leroi, Jonathan Cimino and Maud Vandereyken for their help during *in vivo* experiments as well as the GIGA "Cell Imaging and Flow Cytometry" core facility for their help with flow cytometry. CIRMAP is grateful to the "Belgian Federal Government Office Policy of Science (SSTC)" for general support in the frame of the PAI-7/05, the European Commission and the Wallonia Region (FEDER Program) and OPTI2MAT program of excellence. DM is Research Associates at the National Fund for Scientific Research (FNRS). EH is a FNRS-TELEVIE fellow. AF and AB are FNRS Fellows.

II.2.2. SUPPORTING INFORMATION

a. siRNA complexation, size, and zeta potential

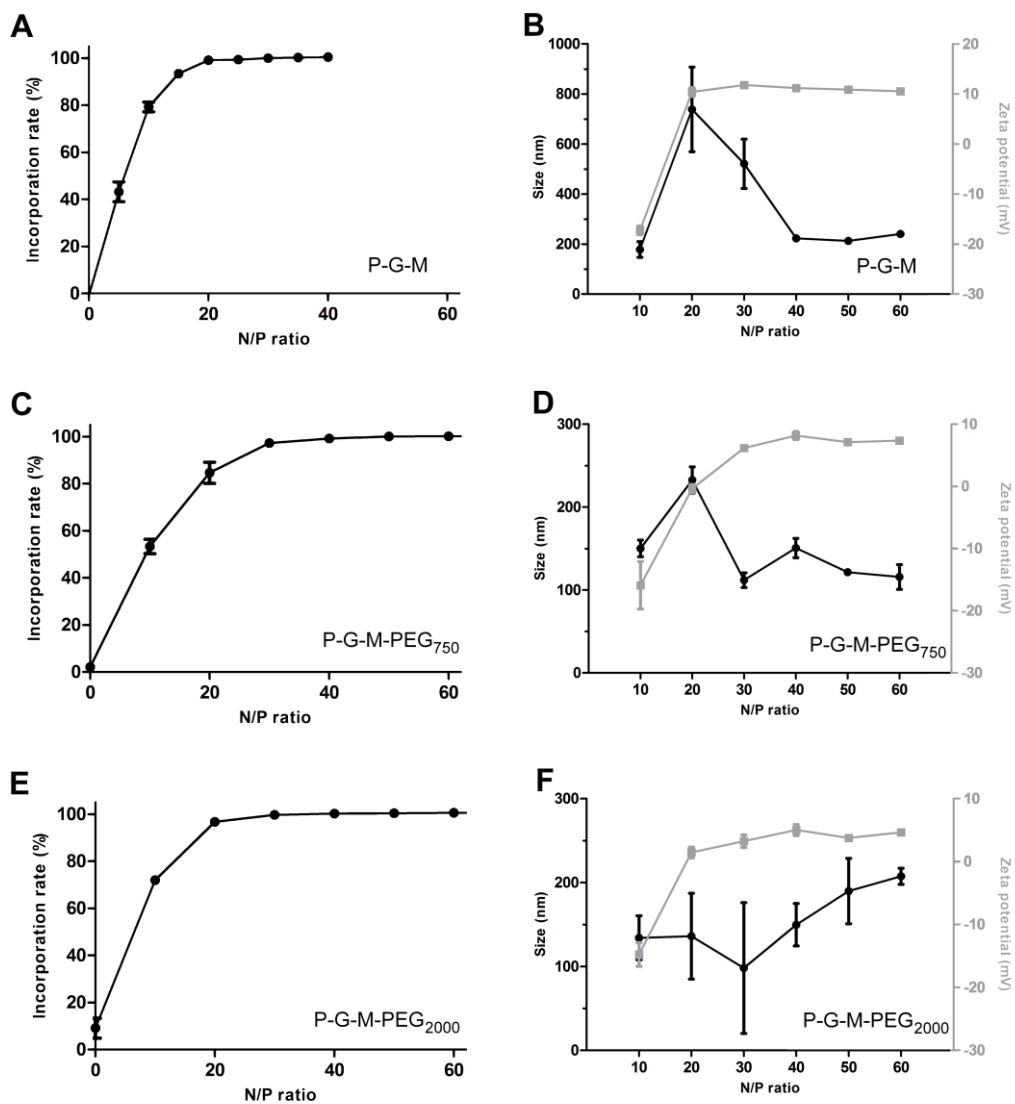


Fig. S1. siRNA complexation rate, size, and zeta potential of P-G-M (**A; B**), P-G-M-PEG₇₅₀ (**C; D**), and P-G-M-PEG₂₀₀₀ (**E; F**) polyplexes as a function of the N/P ratio.

b. Freeze-drying and long-term stability

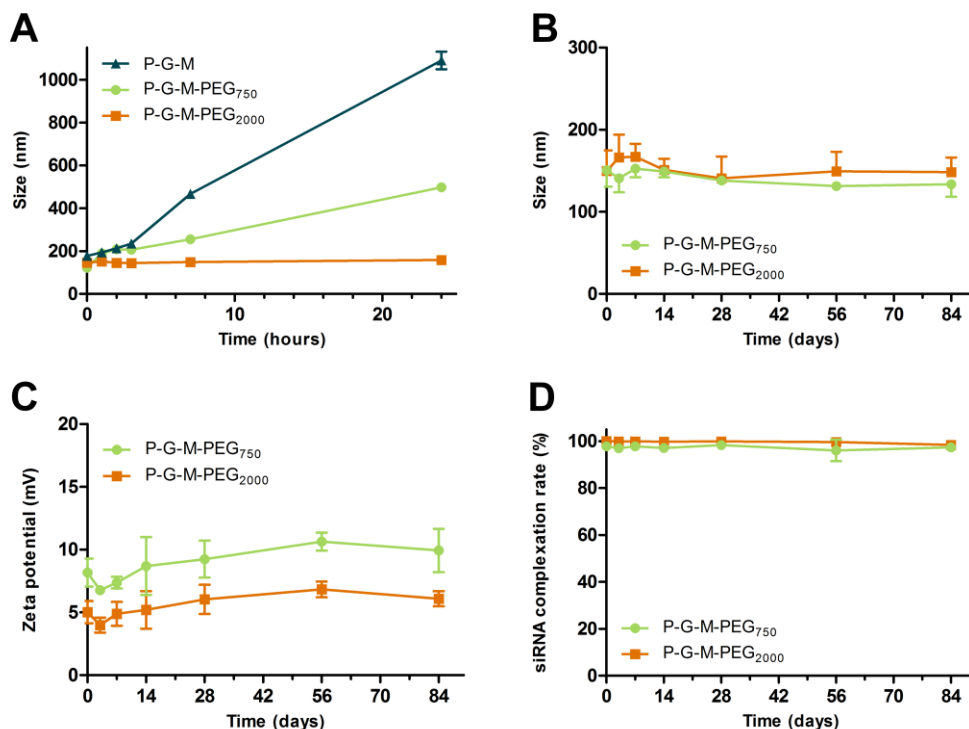


Fig. S2. (A) Size stability over time of polyplex dispersions in TE buffer isotonicized with 5% mannitol. Size (B), zeta potential (C), and siRNA complexation rate (D) after freeze-drying and extemporaneous rehydration in water.

The colloidal dispersions show a low stability over time (**Fig. S2A**). Size increases from the early hours, especially for P-G-M polyplexes. A better stability is observed for both PEGylated micelles, particularly for P-G-M-PEG₂₀₀₀, confirming the observations obtained by TEM. The stability of a colloidal suspension is related to the surface charge of nanoparticles. Under -30 mV and above +30 mV, the dispersion is considered stable due to high electrostatic repulsion between nanoparticles. The more the charge is close to neutrality, the less the suspension is stable. In this case, the surface charge of polyplex micelles is too low to bring sufficient stability by electrostatic repulsions. With PEGylated polymers, stability is increased by steric repulsions between nanoparticles [59]. Nevertheless, it is not sufficient to guarantee stability for several months or years required for a pharmaceutical product. To increase shelf life, we freeze-dried the samples [60]. The use of low binding vials, Daikyo Crystal Zenith[®], was essential. Prepared in classical glass vials, characteristics of polyplexes were modified, probably due to a slight

polymer adhesion on the vial walls (data not shown). Secondly, to ensure the integrity of polyplexes, a cryoprotectant must be added to the suspension. Mannitol, as many sugars like trehalose and sucrose, possesses this characteristic, forming a glassy matrix around the nanoparticles during lyophilization process [60, 61].

Polyplexes were prepared in Daikyo Crystal Zenith® vials (Daikyo Seiko, Tokyo, Japan), and freeze-dried (Heto-Holten DW 8030 freeze-dryer, Vacuubrand RZ8 pump) using the following lyophilization cycle process: freezing at -35°C and 1 bar for 3.5 hours; primary drying at -15°C and 0.8 bar for 3 hours and then at -10°C and 0.1 bar for 12 hours; and secondary drying at +10°C and 0.1 bar for 5 hours. Vials were then closed and sealed under vacuum and stored at -18°C.

In these conditions, PEGylated polyplexes show better stability in terms of size, zeta potential and siRNA complexation until at least three months (**Fig. S2B-C-D**). The integrity of siRNA was also similar after three months of storage (data not shown).

c. Size stability using Dynamic Light Scattering (DLS) in presence of serum (FBS)

In addition to fSPT, size in presence of FBS was also determined using the Zetasizer Nano ZS®, exploiting the DLS technique. Samples were prepared with classic siRNA at a concentration of 100 nM. After the polyplexes formation, FBS was added to reach a concentration of 10%. Samples were analyzed immediately and after 1, 2, and 3 hours incubation at 37°C (**Fig. S3**). The size was evaluated taking into account the peak intensity corresponding to the nanoparticles, without the peaks related to the FBS.

However, 50% FBS was too concentrated in proteins to observe the peak corresponding to nanoparticles. As shown on this figure, it appears that the size increases directly after 10% FBS addition, but stabilizing after 1h and up to 3 h. The increase was greater for P-G-M compared to PEGylated polyplexes, with a diameter around 600-700 nm. The size of P-G-M-PEG₇₅₀ and P-G-M-PEG₂₀₀₀ was located around 300 nm directly after FBS addition, increasing slightly and stabilizing close to 400 nm, from 1 hour to 3 hours.

However, DLS is not the optimal method to determine the size in complex medium. As shown in **Fig. S4**, proteins are also detected and their size peaks appear in the size distribution. Also, the presence of a few aggregates can greatly modify the size distribution through bigger size, because the intensity of the scattered light is proportional to the sixth power of the diameter.

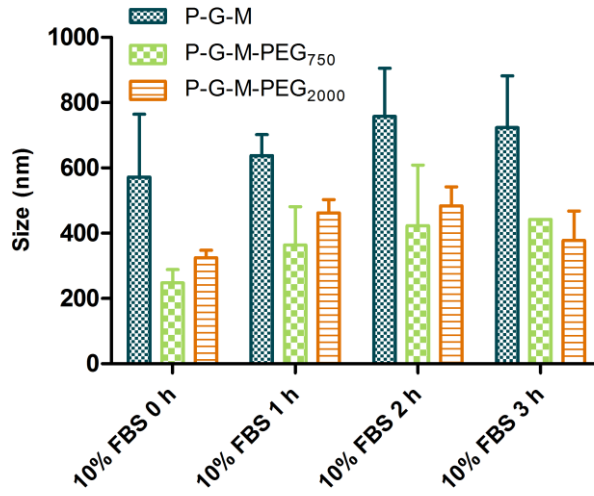


Fig. S3. Evolution of the size of polyplex micelles determined by DLS, directly after addition of 10% FBS and after incubation with 10% FBS at 37°C for 1 h, 2 h, or 3 h.

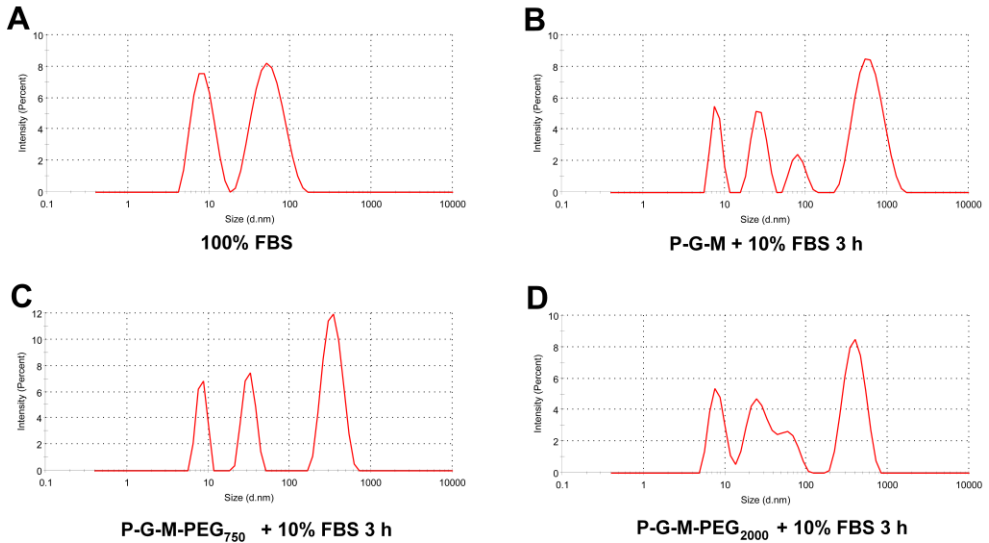


Fig. S4. Distribution of size by intensity observed by DLS for FBS alone **(A)** and for polyplex micelles after 3 hours incubation with FBS at 37°C for P-G-M **(B)**, P-G-M-PEG₇₅₀ **(C)**, and P-G-M-PEG₂₀₀₀ polyplexes **(D)**.

d. Hemocompatibility

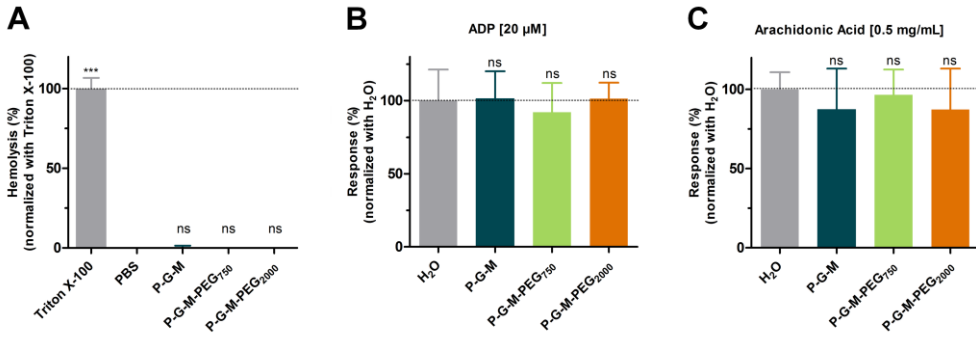


Fig. S5. Supplementary hemocompatibility assays of polyplex micelles, also performed at a final concentration of siRNA of 100 nM. **(A)** Human RBC lysis (% of hemolysis) in washed RBC after 1.5 hour incubation. Triton X-100 (1%) and PBS were respectively used as positive and negative controls. Platelet aggregation induced by ADP **(B)** or AA **(C)** in presence of the different formulations. H₂O is used as negative control. Results are expressed as % of response, normalized with H₂O. Statistical comparisons with negative controls were performed by using one-way ANOVA, followed by the Dunnett's test.

II.3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans cette étude, nous avons comparé deux polymères PEGylés, les P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀, au polymère non PEGylé P-G-M pour lequel l'efficacité *in vitro* a été démontrée auparavant [14]. L'objectif de ce travail était d'évaluer la capacité de ces polymères à former des polyplexes destinés à administrer du siRNA par voie IV.

Les trois polymères sont capables de former des polyplexes aux caractéristiques physico-chimiques requises pour l'administration IV. Les polyplexes formés au N/P 40 avec les polymères PEGylés ont une taille proche de 150 nm. Comme attendu, la charge de surface des polyplexes diminue avec la longueur de la chaîne de PEG, passant de +11,2 mV pour les polyplexes P-G-M à +5 mV pour les P-G-M-PEG₂₀₀₀.

Les lipoplexes lyophilisés conservent leurs propriétés physico-chimiques (incorporation du siRNA, taille et charge initiale) après au moins trois mois de conservation sous vide, à -18°C. Cette technique de conservation pourrait donc être envisagée pour une conservation à long terme [60].

L'ITC a été utilisée pour évaluer l'interaction des polyplexes avec l'albumine, utilisée comme protéine modèle. Cette technique a mis en évidence de faibles interactions entre les polyplexes et l'albumine, et ce pour les trois formulations. Seuls les polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ présentent une interaction légèrement plus faible que les polyplexes P-G-M et P-G-M-PEG₇₅₀. Cette diminution d'interaction avec les protéines apportée par le PEG₂₀₀₀ est logique, puisque c'est le PEG qui provoque le plus d'encombrement stérique, mais l'avantage apporté par rapport aux autres formulations est faible. Le PEG₇₅₀ n'apporte lui aucun avantage en comparaison avec les polyplexes non PEGylés.

En présence de 50 % de sérum, environ 50 % de siRNA sont relargués après 1 heure (mesurée par FCS). Ces valeurs sont observées pour toutes les formulations, PEGylées ou non. Cette quantité de siRNA relargué, bien que paraissant élevée, correspond à des valeurs décrites dans la littérature comme relativement satisfaisantes en ce qui concerne le relargage du siRNA dans un milieu riche en protéines [47, 52, 53]. Dans notre cas, le relargage du siRNA, du à la compétition avec les protéines anioniques [47], n'est pas diminué par la PEGylation des polymères. Il faut également noter que ce relargage semble atteindre un plateau après 1 heure puisque après 3 heures, les quantités de siRNA relargués restent proche de 50 %.

En présence de 10 % de sérum, une augmentation de la taille est observée au cours du temps pour les micelles non PEGylées, probablement à cause de la formation d'agrégats d'un diamètre d'environ 500 nm. En comparaison à d'autres nanoparticules cationiques de la littérature, dont le diamètre peut augmenter jusqu'à parfois plus de 1 μm , cette augmentation de taille semble cependant limitée [56]. Les polyplexes P-G-M-PEG₇₅₀ et -PEG₂₀₀₀ présentent aussi une augmentation de la taille due à la présence de sérum. Cependant, leur taille reste stable au cours du temps et ne varie pas entre 1 heure et 3 heures de contact avec les constituants du sérum. Le PEG ne semble pas empêcher la formation de la couronne de protéines autour des polyplexes, mais semble limiter la formation d'agrégats au cours du temps. Les différences de masse moléculaire entre le PEG₇₅₀ et le PEG₂₀₀₀ ne montrent pas d'influence.

Globalement, les différences de comportement des trois formulations en présence de sérum sont minimales, qu'elles soient PEGylées ou non. Les polyplexes P-G-M montrent étonnamment des interactions modérées avec les protéines plasmatiques. Une des explications possibles est que le bloc morpholine du polymère soit disposé à la surface des polyplexes P-G-M. Cette partie du polymère étant hydrophile, mais très faiblement chargée à pH neutre, elle peut jouer un rôle similaire à celui du PEG en formant une couronne hydratée autour de la nanoparticule, diminuant les interactions entre les protéines anioniques et les fonctions guanidines cationiques [10].

La toxicité sur les cellules endothéliales et les tests d'hémocompatibilités ne montrent aucun effet des trois formulations par rapport aux contrôles négatifs, suggérant qu'elles sont compatibles avec l'administration par la voie IV.

L'étude *in vivo* sur un modèle murin de xénogreffe a montré que l'administration IV de ces polyplexes permettait un ciblage passif de la tumeur grâce à l'effet EPR, malgré une accumulation dans certains organes comme le foie et la rate. Ces organes, dont le système vasculaire présente des fenestrations, sont en effet capables de capturer une certaine proportion des nanoparticules d'un diamètre supérieur à 200 nm [62]. Étonnamment, les polyplexes P-G-M présentent une accumulation pulmonaire, qui pourrait être causée par la rétention d'agrégats dans les fins capillaires du poumon. En effet, il est souvent décrit que les particules proches du micromètre présentent une accumulation rapide au niveau de ces capillaires, trop fins pour les laisser circuler [62]. Il semblerait donc qu'en présence de sang, les polyplexes P-G-M forment de plus gros agrégats que ceux observés en présence de 10 % de sérum. L'ajout de PEG semble ici favoriser le ciblage passif de la tumeur, sans montrer de différence entre le PEG₇₅₀ et le PEG₂₀₀₀.

Cependant, *in vitro*, l'entrée cellulaire des trois formulations est fortement diminuée par la présence de sérum dans le milieu de culture, compromettant l'efficacité de ces polyplexes. La couronne de protéine formée dans ces conditions pourrait masquer la surface des nanoparticules, et être une des causes de la diminution de leur interaction avec les membranes cellulaires [11, 55, 56]. Cette diminution importante de l'entrée cellulaire en milieu riche en protéines fait craindre une perte d'efficacité *in vivo*, mais cela devra être vérifié dans une étude future. En présence de 50 % de sérum, l'entrée cellulaire est même plus faible pour les polyplexes PEGylés que les non PEGylés. Contrairement à nos observations, Yang et ses collègues ont montré une pénétration cellulaire élevée en présence de sérum, pour des polyplexes polycarbonates contenant de l'ADN. Ces polyplexes possèdent des caractéristiques physico-chimiques proches des polyplexes de notre étude (diamètre d'environ 100 nm et charge de surface d'environ +15 mV). Contrairement aux polymères P-G-M-PEG qui contiennent une chaîne de PEG à l'extrémité du polymère, le polymère de Yang comprend une chaîne de PEG comprise entre deux blocs hydrophiles. Cette différence de structure pourrait expliquer la meilleure entrée cellulaire en présence de sérum observée pour leurs polyplexes [63].

Les polyplexes PEGylés présentent une plus faible efficacité *in vitro*, en comparaison avec les polyplexes P-G-M. En effet, la diminution de l'expression de l'ARNm cible obtenue après transfection par les polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ (52 % d'expression relative) n'est pas suffisante pour obtenir la même diminution de prolifération des cellules cancéreuses que celle provoquée par la transfection par les polyplexes P-G-M.

L'inconvénient qu'apporte la PEGylation en termes d'efficacité, bien connu sous le terme de « dilemme du PEG », se vérifie dans le cas de notre étude et ce quelle que soit la longueur de la chaîne de PEG ; tandis que les chaînes de PEG augmentent la stabilité dans les milieux physiologiques, l'interaction avec les membranes plasmiques et endosomales est aussi diminuée, menant finalement à une baisse d'efficacité [58, 64].

Afin de combiner à la fois une bonne stabilité dans le sang permettant une accumulation des polyplexes au niveau de la tumeur, et une efficacité de dégradation de l'ARNm HDAC5 *in vivo*, menant à la diminution de prolifération des cellules cancéreuses, des alternatives à la stratégie de PEGylation classique devraient être envisagées [59]. Une première solution pourrait être d'utiliser une liaison labile entre le PEG et le reste du copolymère, sensible à la dégradation une fois la particule arrivée au niveau du micro-environnement tumoral, comme une liaison sensible au pH, plus faible dans l'environnement de la tumeur [65], ou à une enzyme surexprimée,

comme la métalloprotéinase [66]. Des polymères autres que le PEG peuvent être aussi utilisé pour modifier la surface des nanoparticules.

II.4. RÉFÉRENCES

1. Geihe, E.I., Cooley, C.B., Simon, J.R., Kiesewetter, M.K., Edward, J.A., Hickerson, R.P., *et al.*, *Designed guanidinium-rich amphipathic oligocarbonate molecular transporters complex, deliver and release siRNA in cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): 13171-13176.
2. Bartolini, C., Mespouille, L., Verbruggen, I., Willem, R., Dubois, P., *Guanidine-based polycarbonate hydrogels: from metal-free ring-opening polymerization to reversible self-assembling properties*, Soft Matter, 2011. **7**(20): 9628-9637.
3. Choi, J.L., Tan, J.-K.Y., Sellers, D.L., Wei, H., Horner, P.J., Pun, S.H., *Guanidinylated block copolymers for gene transfer: A comparison with amine-based materials for in vitro and in vivo gene transfer efficiency*, Biomaterials, 2015. **54**: 87-96.
4. Reschner, A., Shim, Y.H., Dubois, P., Delvenne, P., Evrard, B., Marcelis, L., *et al.*, *Evaluation of a new biocompatible poly(N-(morpholino ethyl methacrylate)-based copolymer for the delivery of ruthenium oligonucleotides, targeting HPV16 E6 oncogene*, J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(8): 1432-1440.
5. Zhao, Z.X., Gao, S.Y., Wang, J.C., Chen, C.J., Zhao, E.Y., Hou, W.J., *et al.*, *Self-assembly nanomicelles based on cationic mPEG-PLA-b-Polyarginine(R15) triblock copolymer for siRNA delivery*, Biomaterials, 2012. **33**(28): 6793-6807.
6. Omedes Pujol, M., Coleman, D.J.L., Allen, C.D., Heidenreich, O., Fulton, D.A., *Determination of key structure-activity relationships in siRNA delivery with a mixed micelle system*, Journal of Controlled Release, 2013. **172**(3): 939-945.
7. Li, J., Chen, Q., Zha, Z., Li, H., Toh, K., Dirisala, A., *et al.*, *Ternary polyplex micelles with PEG shells and intermediate barrier to complexed DNA cores for efficient systemic gene delivery*, J Control Release, 2015. **209**: 77-87.
8. Bishop, C.J., Kozielski, K.L., Green, J.J., *Exploring the role of polymer structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles*, J Control Release, 2015. **219**: 488-499.
9. Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L.M., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*, Adv Drug Deliv Rev, 2016. **99**(Pt A): 28-51.
10. Beck-Broichsitter, M., Nicolas, J., Couvreur, P., *Design attributes of long-circulating polymeric drug delivery vehicles*, Eur J Pharm Biopharm, 2015. **97**(Pt B): 304-317.
11. Wang, T., Upponi, J.R., Torchilin, V.P., *Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies*, Int J Pharm, 2012. **427**(1): 3-20.
12. Kolate, A., Baradia, D., Patil, S., Vhora, I., Kore, G., Misra, A., *PEG - a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems*, J Control Release, 2014. **192**: 67-81.
13. Frère, A., Baroni, A., Hendrick, E., Delvigne, A.-S., Orange, F., Peulen, O., *et al.*, *PEGylated and functionalized aliphatic polycarbonate polyplex micelles for intravenous administration of HDAC5 siRNA in cancer therapy*, in preparation.
14. Frère, A., Kawalec, M., Tempelaar, S., Peixoto, P., Hendrick, E., Peulen, O., *et al.*, *Impact of the Structure of Biocompatible Aliphatic Polycarbonates on siRNA Transfection Ability*, Biomacromolecules, 2015. **16**(3): 769-779.
15. Peixoto, P., Castronovo, V., Matheus, N., Polese, C., Peulen, O., Gonzalez, A., *et al.*, *HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells*, Cell Death & Differentiation, 2012. **19**(7): 1239-1252.
16. Fan, J., Lou, B., Chen, W., Zhang, J., Lin, S., Lv, F.F., *et al.*, *Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest*, Tumour Biol, 2014. **35**(11): 11523-11532.
17. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*, Nature, 1998. **391**(6669): 806-811.
18. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*, Nature, 2001. **411**(6836): 494-498.
19. Oh, Y.K., Park, T.G., *siRNA delivery systems for cancer treatment*, Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(10): 850-862.

20. Corbet, C., Ragelle, H., Pourcelle, V., Vanvarenberg, K., Marchand-Brynaert, J., Pr eat, V., *et al.*, *Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method*, Journal of Controlled Release, 2016. **223**: 53-63.
21. Daka, A., Peer, D., *RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy*, Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(13): 1508-1521.
22. Bertrand, N., Leroux, J.C., *The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective*, J Control Release, 2012. **161**(2): 152-163.
23. Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G., Haisma, H.J., *Endosomal escape pathways for delivery of biologicals*, J Control Release, 2011. **151**(3): 220-228.
24. Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H., *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*, Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): 136-151.
25. Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J.C., Jin, T., Dai, K., *et al.*, *Uptake mechanisms of non-viral gene delivery*, J Control Release, 2012. **158**(3): 371-378.
26. Barua, S., Mitragotri, S., *Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects*, Nano Today, 2014. **9**(2): 223-243.
27. Glozak, M.A., Seto, E., *Histone deacetylases and cancer*, Oncogene, 2007. **26**(37): 5420-5432.
28. Zhang, L., Han, Y., Jiang, Q., Wang, C., Chen, X., Li, X., *et al.*, *Trend of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: isoform selectivity or multitargeted strategy*, Med Res Rev, 2015. **35**(1): 63-84.
29. Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T.L., Wang, G., *Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents*, Molecules, 2015. **20**(3): 3898-3941.
30. Zhang, J., Zhong, Q., *Histone deacetylase inhibitors and cell death*, Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(20): 3885-3901.
31. Chun, P., *Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors*, Arch Pharm Res, 2015. **38**(6): 933-949.
32. Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., *et al.*, *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*, Nature, 1999. **401**(6749): 188-193.
33. Tempelaar, S., Mespouille, L., Coulembier, O., Dubois, P., Dove, A.P., *Synthesis and post-polymerisation modifications of aliphatic poly(carbonate)s prepared by ring-opening polymerisation*, Chem Soc Rev, 2013. **42**(3): 1312-1336.
34. Chen, W., Meng, F., Cheng, R., Deng, C., Feijen, J., Zhong, Z., *Advanced Drug and Gene Delivery Systems Based on Functional Biodegradable Polycarbonates and Copolymers*, Journal of Controlled Release, 2014. **190**: 398-414.
35. Ong, Z.Y., Fukushima, K., Coady, D.J., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Rational design of biodegradable cationic polycarbonates for gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 120-126.
36. De la Rosa, V.R., Tempelaar, S., Dubois, P., Hoogenboom, R., Mespouille, L., *Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-polycarbonate block copolymers: From improved end-group control in poly(2-oxazoline)s to chain extension with aliphatic polycarbonate through a fully metal-free ring-opening polymerisation process*, Polym. Chem., 2016.
37. Mespouille, L., Coulembier, O., Kawalec, M., Dove, A.P., Dubois, P., *Implementation of metal-free ring-opening polymerization in the preparation of aliphatic polycarbonate materials*, Progress in Polymer Science, 2014. **39**(6): 1144-1164.
38. Nachtergaele, A., Coulembier, O., Dubois, P., Helvenstein, M., Duez, P., Blankert, B., *et al.*, *Organocatalysis paradigm revisited: are metal-free catalysts really harmless?*, Biomacromolecules, 2015. **16**(2): 507-514.
39. Mespouille, L., Nederberg, F., Hedrick, J.L., Dubois, P., *Broadening the Scope of Functional Groups Accessible in Aliphatic Polycarbonates by the Introduction of RAFT Initiating Sites*, Macromolecules, 2009. **42**(16): 6319-6321.
40. Palchetti, S., Colapicchioni, V., Digiaco, L., Caracciolo, G., Pozzi, D., Capriotti, A.L., *et al.*, *The protein corona of circulating PEGylated liposomes*, Biochim Biophys Acta, 2015. **1858**(2): 189-196.
41. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*, Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(1): 1-9.
42. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*, Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): 271-284.
43. Laloy, J., Minet, V., Alpan, L., Mullier, F., Beken, S., Toussaint, O., *et al.*, *Impact of Silver Nanoparticles on Haemolysis, Platelet Function and Coagulation*, Nanobiomedicine, 2014. **1**.

44. Gomes-da-Silva, L.C., Fonseca, N.A., Moura, V., Pedroso de Lima, M.C., Simoes, S., Moreira, J.N., *Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges*, Acc Chem Res, 2012. **45**(7): 1163-1171.
45. Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., *et al.*, *Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): 2050-2055.
46. Buyens, K., Lucas, B., Raemdonck, K., Braeckmans, K., Vercammen, J., Hendrix, J., *et al.*, *A fast and sensitive method for measuring the integrity of siRNA-carrier complexes in full human serum*, J Control Release, 2008. **126**(1): 67-76.
47. Dakwar, G.R., Zagato, E., Delanghe, J., Hobel, S., Aigner, A., Denys, H., *et al.*, *Colloidal stability of nano-sized particles in the peritoneal fluid: towards optimizing drug delivery systems for intraperitoneal therapy*, Acta Biomater, 2014. **10**(7): 2965-2975.
48. Braeckmans, K., Buyens, K., Bouquet, W., Vervaeet, C., Joye, P., De Vos, F., *et al.*, *Sizing nanomatter in biological fluids by fluorescence single particle tracking*, Nano Lett, 2010. **10**(11): 4435-4442.
49. Peulen, O., Gonzalez, A., Peixoto, P., Turtoi, A., Mottet, D., Delvenne, P., *et al.*, *The anti-tumor effect of HDAC inhibition in a human pancreas cancer model is significantly improved by the simultaneous inhibition of cyclooxygenase 2*, PLoS One, 2013. **8**(9): e75102.
50. Turnbull, W.B., Daranas, A.H., *On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?*, Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(48): 14859-14866.
51. Velazquez Campoy, A., Freire, E., *ITC in the post-genomic era...? Priceless*, Biophys Chem, 2005. **115**(2-3): 115-124.
52. Novo, L., Takeda, K.M., Petteta, T., Dakwar, G.R., van den Dikkenberg, J.B., Remaut, K., *et al.*, *Targeted decationized polyplexes for siRNA delivery*, Mol Pharm, 2015. **12**(1): 150-161.
53. Oliveira, A.C., Raemdonck, K., Martens, T., Rombouts, K., Simon-Vazquez, R., Botelho, C., *et al.*, *Stealth monoolein-based nanocarriers for delivery of siRNA to cancer cells*, Acta Biomater, 2015. **25**: 216-229.
54. Fleischer, C.C., Payne, C.K., *Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes*, Acc Chem Res, 2014. **47**(8): 2651-2659.
55. Hadjidemetriou, M., Al-Ahmady, Z., Mazza, M., Collins, R.F., Dawson, K., Kostarelos, K., *In Vivo Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles*, ACS Nano, 2015. **9**(8): 8142-8156.
56. Dakwar, G.R., Braeckmans, K., Demeester, J., Ceelen, W., Smedt, S.C.D., Remaut, K., *Disregarded Effect of Biological Fluids in siRNA Delivery: Human Ascites Fluid Severely Restricts Cellular Uptake of Nanoparticles*, ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(43): 24322-24329.
57. Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P., Gladwin, M.T., *The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease*, Jama, 2005. **293**(13): 1653-1662.
58. Hama, S., Itakura, S., Nakai, M., Nakayama, K., Morimoto, S., Suzuki, S., *et al.*, *Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry*, J Control Release, 2015. **206**: 67-74.
59. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*, Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(36): 6288-6308.
60. Fonte, P., Reis, S., Sarmento, B., *Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery*, Journal of Controlled Release, 2016. **225**: 75-86.
61. Jain, A., Thakur, K., Sharma, G., Kush, P., Jain, U.K., *Fabrication, characterization and cytotoxicity studies of ionically cross-linked docetaxel loaded chitosan nanoparticles*, Carbohydr Polym, 2016. **137**: 65-74.
62. Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*, Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): 941-951.
63. Yang, C., Ong, Z.Y., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Novel biodegradable block copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and cationic polycarbonate: effects of peg configuration on gene delivery*, Macromol Rapid Commun, 2011. **32**(22): 1826-1833.
64. Mishra, S., Webster, P., Davis, M.E., *PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles*, Eur J Cell Biol, 2004. **83**(3): 97-111.
65. Mo, R., Gu, Z., *Tumor microenvironment and intracellular signal-activated nanomaterials for anticancer drug delivery*, Materials Today, 2015. In Press.
66. Hatakeyama, H., Akita, H., Kogure, K., Oishi, M., Nagasaki, Y., Kihira, Y., *et al.*, *Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid*, Gene Ther, 2007. **14**(1): 68-77.

III. ALTERNATIVE À LA PEGYLATION : L'ACIDE HYALURONIQUE

III.1. INTRODUCTION

L'utilisation de PEG afin d'augmenter la stabilité *in vivo* des polyplexes nous a confronté au « dilemme du PEG » [1, 2]. En effet, alors que l'agrégation des protéines est légèrement diminuée et que les polyplexes PEGylés montrent une bonne accumulation au niveau de la tumeur après une administration par la voie IV, l'efficacité *in vitro* de ces polyplexes est significativement plus faible (niveau d'expression de la protéine ciblée peu diminué et absence d'effet anti prolifératif sur les cellules cancéreuses HCT116). Aussi, plus étonnamment, l'entrée cellulaire des polyplexes PEGylés est fortement diminuée en présence de sérum, et ce, de manière encore plus importante que pour les polyplexes non PEGylés. Malgré que ces polyplexes soient capables de conduire le siRNA jusqu'au site de la tumeur, leur efficacité est donc fortement compromise.

Afin de parvenir à la formation de polyplexes combinant (i) une résistance à l'adsorption des protéines plasmatiques et à la reconnaissance par le système immunitaire, (ii) un ciblage passif de la tumeur (iii) et une efficacité en présence d'un milieu physiologique complexe, nous avons envisagé une alternative à la PEGylation. Pour ce faire, nous avons utilisé l'acide hyaluronique (HA) afin de recouvrir la surface des polyplexes cationiques. L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel, composé de répétitions de glucuronate et de *N*-acétyl glucosamine (Figure III.1). Il est un des principaux constituants de la matrice extracellulaire des vertébrés, où il joue un rôle structurel important dû à ses propriétés hydrodynamiques uniques, comme au niveau des articulations et de la peau [3].

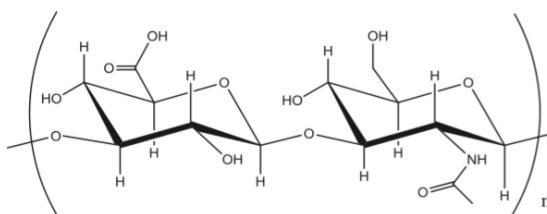


Figure III.1. Structure chimique de l'acide hyaluronique [4].

Dans le cadre de cette étude, l'acide hyaluronique est utilisé sous la forme de sel sodique (hyaluronate de sodium), pour recouvrir la surface cationique des polyplexes non PEGylés. Grâce à ses propriétés anioniques et non immunogènes, le hyaluronate de sodium peut jouer

un rôle similaire à celui du PEG en augmentant le temps de demi-vie dans le compartiment sanguin [3-5]. En effet, l'acide hyaluronique est capable de former une couronne autour de la nanoparticule, provoquant un encombrement stérique à sa surface. De plus, il confère une charge négative aux nanoparticules. Ces deux propriétés ont pour objectif de limiter les interactions avec les protéines sanguines. Cependant, contrairement aux polymères PEGylés utilisés précédemment, la liaison du hyaluronate sodique aux polyplexes a été réalisée grâce à des interactions ioniques, et non covalentes (Figure III.2). Les forces de liaison entre le hyaluronate et les polyplexes sont donc plus faibles que pour le PEG, pouvant éventuellement mener plus facilement à leur dissociation.

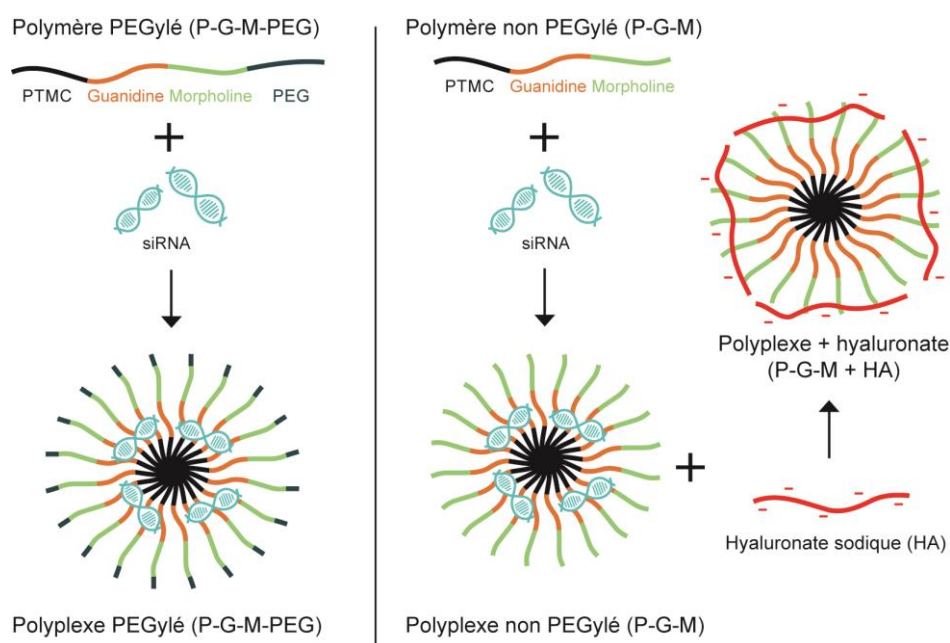


Figure III.2. Contrairement au PEG, lié de façon covalente au polymère P-G-M, le hyaluronate sodique est lié par des interactions électrostatiques aux polyplexes cationiques non PEGylés.

Un autre avantage de l'acide hyaluronique est que CD44, un de ses récepteurs, est surexprimé au niveau de nombreuses cellules tumorales, donnant à ce polymère naturel un rôle de ligand d'adressage [4, 6]. Selon la littérature, les cellules HeLa et HCT116, utilisées dans cette étude, présentent une surexpression du récepteur CD44 par rapport à des cellules non cancéreuses [7, 8].

Différentes études portant sur l'utilisation d'acide hyaluronique pour recouvrir la surface de nanoparticules ont déjà été réalisées. Par exemple, Wojcicki et ses collaborateurs ont formulé des lipoplexes contenant de l'acide hyaluronique conjugué à du DOPE. Les différentes formulations ont montré une faible activation du complément *in vitro*, due à une faible interaction des lipoplexes avec les protéines plasmatiques. Malgré leur potentiel zêta négatif, ces lipoplexes ont présenté une entrée cellulaire élevée grâce aux interactions avec le récepteur CD44 [9]. Dernièrement, Ravar et son équipe ont recouvert des liposomes cationiques de paclitaxel avec de l'acide hyaluronique. Comparés au paclitaxel, ces liposomes recouverts d'acide hyaluronique ont une meilleure efficacité antitumorale *in vivo*. Les auteurs expliquent cette meilleure efficacité par la présence d'une concentration plus élevée de paclitaxel au niveau tumoral lorsqu'il est administré sous la forme de liposomes. Cette concentration plus élevée est obtenue grâce à la combinaison de l'effet de la petite taille des liposomes (106 nm), qui permet un ciblage passif de la tumeur, et de la surexpression du récepteur CD44 au niveau tumoral qui permet un ciblage actif [10].

Cette étude préliminaire évalue principalement le comportement des polyplexes *Bz-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM* recouverts de hyaluronate sodique en présence de sérum, en termes de stabilité de taille, d'entrée cellulaire et d'efficacité *in vitro*. En effet, nous avons montré précédemment que les polyplexes PEGylés sont capables d'atteindre la tumeur. Cependant, leur efficacité est diminuée dans un milieu sans sérum par rapport aux polyplexes non PEGylés [11] et leur entrée cellulaire diminue *in vitro* en présence de sérum. Pour espérer obtenir une efficacité optimale *in vivo*, il est primordial que, *in vitro*, en présence de sérum, les polyplexes puissent pénétrer dans la cellule, libérer le siRNA et ainsi dégrader l'ARNm cible.

III.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

La plupart des matériels et des méthodes sont identiques à ceux détaillés dans nos précédents travaux [11, 12].

III.2.1. LA FORMATION DES POLYPLEXES

Le polymère polycarbonate utilisé est le polymère de structure *Bz-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM* [11, 12], composée d'un bloc de polycarbonate aliphatique, d'un bloc fonctionnalisé par des groupements guanidines et d'un dernier fonctionnalisé par des groupements morpholines. Les polyplexes sont formés au rapport N/P de 40 à une concentration en siRNA de 100 nM, dans du tampon TE isotonicisé par 5 % de mannitol, en suivant le protocole décrit précédemment [12]. Après leur

formation, le hyaluronate sodique (151 - 300 kDa, Lifecore Biomedical, Chaska, MN, U.S.A.), en solution à 1 mg/mL dans le même tampon, est ajouté aux polyplexes à raison de 5 ou 12,5 % (m/m) par rapport au polymère polycarbonate. La dispersion de polyplexes est mélangée et laissée 15 minutes à température ambiante pour permettre la formation de la couche de hyaluronate par interactions électrostatiques (Figure III.2). Les polyplexes formés par le polymère *Bz-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM* sont abrégés **P-G-M**, et ceux contenant 5 % ou 12,5% de hyaluronate sodique sont abrégés respectivement **P-G-M + HA 5** et **P-G-M + HA 12,5**.

III.2.2. L'EFFICACITÉ DE DÉGRADATION DE L'ARNM EN PRÉSENCE DE SÉRUM

L'efficacité des polyplexes est évaluée après leur incubation en présence ou en l'absence de sérum. Les polyplexes sont préparés avec du siRNA HDAC5 ou du siRNA GL3, à une concentration de 600 nM. Après leur formation, ils sont dilués jusqu'à 100 nM en siRNA avec de l'Opti-MEM® et du FBS pour atteindre une concentration finale en sérum de 0, 10 ou 50 % (v/v). Les polyplexes sont ensuite incubés 1 heure à 37 °C avant d'être ajoutés aux cellules HeLa pendant trois heures. Les cellules sont lavées deux fois au PBS, puis incubées pendant 48 heures en présence de DMEM supplémenté avec 10 % de FBS.

Pour les cellules transfectées deux fois, le deuxième cycle de transfection est réalisé en suivant le même protocole, 24 heures après le premier cycle. Les cellules sont ensuite lavées et incubées pendant 24 heures supplémentaires pour atteindre au total 48 heures d'incubation. L'objectif visé par ces deux cycles de transfection est de réduire au maximum le niveau d'expression de la protéine ciblée afin d'interférer complètement avec son activité intracellulaire.

L'ARNm est finalement extrait et l'expression relative de l'ARNm HDAC5 est déterminée par RT-qPCR selon le protocole décrit précédemment [12].

III.3. RÉSULTATS

III.3.1. L'INCORPORATION, LA TAILLE ET LE POTENTIEL ZËTA

L'incorporation du siRNA dans les polyplexes P-G-M, ainsi que leur taille et leur potentiel zêta sont déterminés [12] avant et après l'ajout de 5 % ou de 12,5 % (m/m) de hyaluronate sodique.

Le diamètre des polyplexes P-G-M est de 234 ± 28 nm et leur charge de surface est de $+10 \pm 2$ mV. Après l'ajout de 5 % de hyaluronate sodique (P-G-M + HA 5), on peut observer une

augmentation de la taille atteignant 396 ± 81 nm, ainsi qu'une diminution du potentiel zêta jusqu'à une valeur négative de -15 ± 4 mV (Figure III.3). Après l'addition de 12,5 % de hyaluronate sodique (P-G-M + HA 12,5), le diamètre des nanoparticules se rapproche de la valeur observée pour les polyplexes P-G-M, avec un diamètre moyen de 224 ± 31 nm. La charge évolue, quant à elle, vers une valeur plus négative, pour atteindre -24 ± 0 mV (Figure III.3).

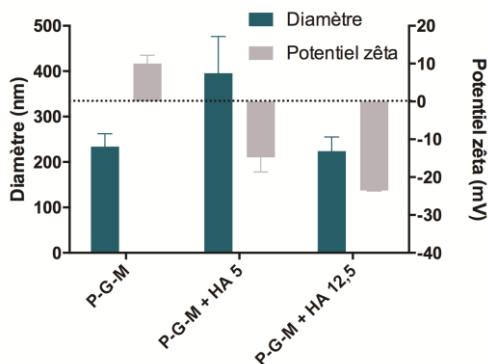


Figure III.3. Diamètre et potentiel zêta des polyplexes P-G-M, P-G-M + HA 5 et P-G-M + HA 12,5 (n=3, moyenne \pm SD).

L'incorporation du siRNA, proche de 100 % pour les polyplexes P-G-M [11], ne varie pas en présence de hyaluronate sodique.

III.3.2. LE COMPORTEMENT EN PRÉSENCE DE SÉRUM

III.3.2.i. L'évolution de la taille

Afin d'évaluer si les protéines plasmatiques sont capables de former une couronne autour des polyplexes, la taille des nanoparticules a été mesurée en présence de 10 % de FBS à 37°C. L'évolution de la taille a été suivie en fonction du temps de contact entre le FBS et les polyplexes. La Figure III.4 montre que l'ajout de FBS provoque une augmentation de la taille plus ou moins élevée en fonction du type de polyplexes.

La taille des polyplexes P-G-M augmente de 234 ± 28 nm à 478 ± 170 nm dès l'ajout de 10 % de FBS, et la taille continue à augmenter jusqu'à 635 ± 33 nm après 3 heures d'exposition à 10 % de FBS.

La taille des polyplexes P-G-M + HA 5 n'est presque pas modifiée au cours du temps, passant de 396 ± 81 nm dans le tampon à 492 ± 88 nm après 3 heures d'incubation en présence de 10 % de sérum. Cependant, leur taille est au départ plus élevée que celle des autres polyplexes.

La taille des polyplexes P-G-M + HA 12,5 augmente elle aussi, mais de façon plus limitée puisqu'elle est de 224 nm \pm 31 nm dans le tampon et de 359 ± 29 nm après 3 heures d'incubation en présence de 10 % de sérum.

Après les 3 heures en présence de 10 % de FBS, les polyplexes de plus grande taille sont les P-G-M avec un diamètre de 635 ± 33 nm, suivi des P-G-M + HA 5 de 492 ± 88 nm puis des polyplexes P-G-M + HA 12,5 d'une taille de 359 ± 29 nm.

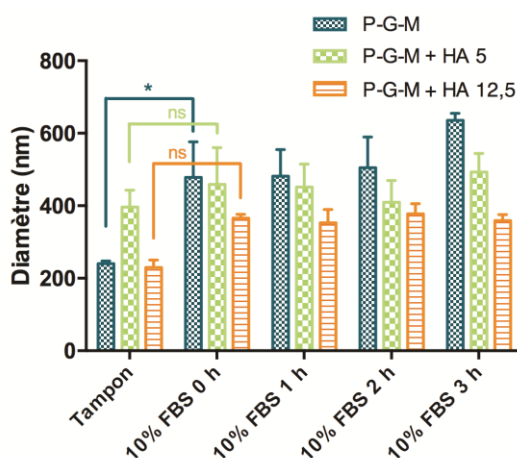


Figure III.4. Évolution de la taille des polyplexes en présence de 10 % de sérum déterminée par DLS. Le diamètre est mesuré dans le tampon, directement après l'ajout de 10 % de FBS et après 1, 2 et 3 heures d'incubation à 37 °C. L'analyse statistique est réalisée en utilisant un two-way ANOVA, suivi d'un post test de Bonferroni ($n=3$, moyenne \pm SD, ns : non significatif, * : $p < 0,05$).

III.3.2.ii. L'entrée cellulaire

L'effet de la présence de sérum sur la capacité des polyplexes P-G-M, avec ou sans hyaluronate sodique, à entrer dans les cellules est évalué par cytométrie en flux. Les cellules sont traitées avec les polyplexes en absence de sérum (Opti-MEM®) ou en présence de 10 %, 30 % ou 50 % de FBS à 37°C. La valeur de MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) correspond à la quantité moyenne de siRNA fluorescent par cellule.

En l'absence de sérum, la pénétration cellulaire est identique pour les polyplexes P-G-M (MFI = 228 ± 32) et P-G-M + HA 5 (MFI = 238 ± 21), tandis que celle des P-G-M + HA 12,5 est environ deux fois plus faible (MFI = 101 ± 36) (Figure III.5).

En présence de 10 % de sérum, seule l'entrée cellulaire des polyplexes P-G-M sans hyaluronate diminue significativement, passant d'un MFI de 228 ± 32 à un MFI de 45 ± 12 . Les polyplexes qui présentent la meilleure entrée cellulaire dans 10 % de FBS sont les P-G-M + HA 5 avec un MFI de 216 ± 21 .

Avec l'augmentation de la concentration en sérum, nous observons une diminution progressive de l'entrée cellulaire. Cette diminution est plus marquée pour les polyplexes P-G-M. Les polyplexes P-G-M + HA 5 gardent le MFI le plus élevé comparés aux autres formulations. En présence de 50 % de FBS, le MFI est de 11 ± 8 pour les polyplexes P-G-M, de 102 ± 5 pour les P-G-M + HA 5 et de 16 ± 11 pour les P-G-M + HA 12,5.

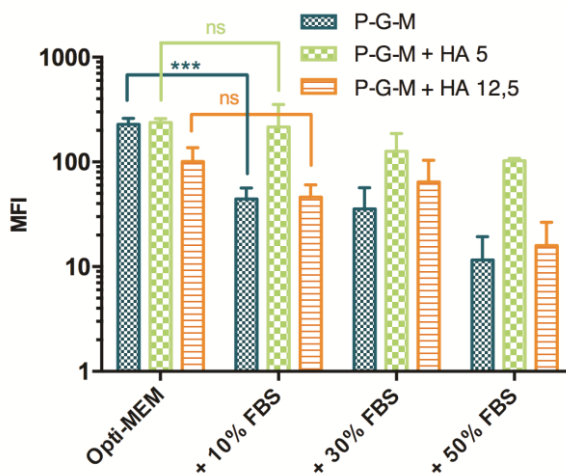


Figure III.5. Intensité moyenne de fluorescence (MFI) des cellules traitées par les polyplexes P-G-M, P-G-M + HA 5 et P-G-M + HA 12,5, en présence d'Opti-MEM® ou de 10 %, 30 % ou 50 % de FBS. Le MFI est normalisé par rapport aux cellules non traitées. L'analyse statistique est réalisée en utilisant un two-way ANOVA, suivi d'un post test de Bonferroni ($n=3$, moyenne \pm SD, ns : non significatif, *** : $p < 0,001$).

III.3.2.iii. L'efficacité de dégradation de l'ARNm

L'efficacité des polyplexes P-G-M et P-G-M + HA 5 a été déterminée après leur incubation en présence de 10 % ou 50 % de sérum, et comparée à l'efficacité en milieu de transfection de

référence pauvre en protéine (Opti-MEM®). Leur efficacité est évaluée après un ou deux cycles de transfection. Les polyplexes P-G-M + HA 12,5 n'ont pas été testés, car ces derniers montrent une plus faible entrée cellulaire que les P-G-M + HA 5 (Figure III.5), et sont donc susceptibles d'être moins efficaces.

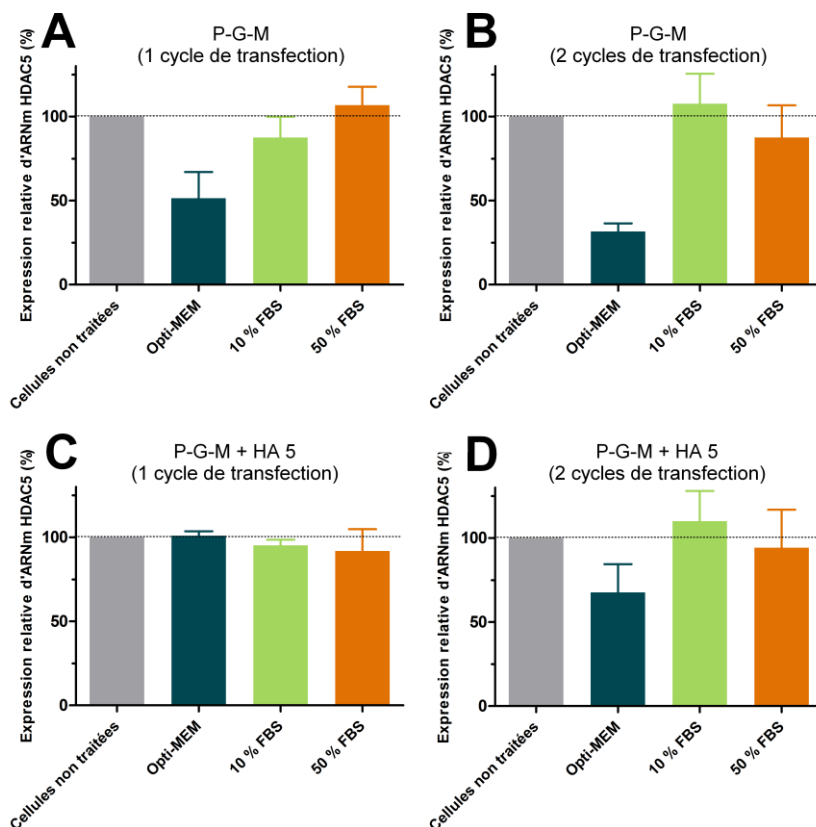


Figure III.6. Efficacité *in vitro* des polyplexes en présence d'Opti-MEM®, de 10 % ou de 50 % de FBS. Expression relative d'ARNm HDAC5 déterminée par RT-qPCR dans les cellules HeLa, 48 heures après le premier cycle de transfection par les polyplexes (A) P-G-M (un cycle de transfection), (B) P-G-M (deux cycles), (C) P-G-M + HA 5 (un cycle) et (D) P-G-M + HA 5 (deux cycles). Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport aux valeurs de β -actine et exprimées en pourcentage de la valeur obtenue par le siRNA irrelevant (n=2, moyenne \pm SD).

L'expression relative de l'ARNm déterminée par RT-qPCR démontre que pour les polyplexes P-G-M (Figure III.6A et B), l'efficacité en absence de sérum est semblable aux résultats précédemment obtenus [11, 12], avec une diminution de l'expression de 49 % après un cycle de transfection, et de 68 % après le deuxième cycle de transfection. Cependant, ces polyplexes

ne présentent pas d'efficacité en présence de 10 ou 50 % de FBS, et ce, même après deux cycles de transfection.

Les polyplexes P-G-M + HA 5 présentent quant à eux une efficacité plus faible que les polyplexes P-G-M dans l'Opti-MEM®. La diminution de l'expression de l'ARNm HDAC5 n'est pas significative après un cycle de transfection, et est de 32 % après deux cycles (Figure III.6C et D). En présence de sérum (10 et 50 %), les polyplexes P-G-M + HA 5 ne montrent aucune efficacité. La diminution de l'expression de l'ARNm est effectivement quasiment nulle (Figure III.6C et D).

III.4. DISCUSSION

Au niveau de la taille des polyplexes, l'ajout de 5 % de hyaluronate provoque une augmentation du diamètre moyen (396 ± 81 nm). Cette valeur dépasse la taille théoriquement requise pour obtenir un ciblage tumoral passif après une administration IV [13]. Cette augmentation de la taille pourrait aussi perturber la pénétration cellulaire. En effet, les modifications de taille des nanoparticules peuvent modifier les mécanismes par lesquelles elles pénètrent dans les cellules, en modifiant par exemple la voie d'entrée, et donc le devenir intracellulaire [14]. Par contre, la taille des polyplexes P-G-M + HA 12,5 reste proche de 200 nm, une valeur plus en adéquation avec celle requise pour l'administration IV [15]. Ces différences de diamètre observées lorsque l'on ajoute 5 ou 12,5 % de hyaluronate pourraient être expliquées par une interaction plus faible entre les polyplexes et le hyaluronate à la concentration de 5 %, formant une couronne moins dense. Ce phénomène est comparable à celui responsable de la taille élevée des polyplexes formés aux faibles rapports N/P (Figure I.1).

Au niveau de la charge (Figure III.3), la diminution de charge de surface observée avec la concentration en HA (+10 mV sans HA, -15 mV avec 5 % de HA et -24 mV avec 12,5 % de HA) pourrait s'expliquer par le fait que le hyaluronate sodique, anionique, recouvre la surface cationique des polyplexes P-G-M [10]. Comme pour les PEG, cette diminution de charge pourrait théoriquement diminuer les interactions avec les protéines plasmatiques chargées négativement, mais, de façon antagoniste, pourrait aussi diminuer l'interaction avec la membrane plasmique des cellules chargées négativement [16].

La présence d'acide hyaluronique ne modifie pas le taux d'encapsulation du siRNA. Celui-ci reste proche de 100 %, quel que soit le pourcentage de hyaluronate ajouté. Par son caractère anionique, le hyaluronate pourrait intervenir comme agent compétiteur de la complexation et

provoquer un relargage du siRNA. En effet, en présence des polyplexes, des agents anioniques comme l'héparine sont capables d'entrer en compétition au niveau du polymère et de causer la libération du siRNA. Pour cette raison, l'héparine est souvent utilisée pour déterminer la force d'interaction entre le polymère et le siRNA [17, 18]. Dans le cadre d'une interaction électrostatique non covalente avec un adjuvant, afin d'exclure un déplacement du complexe, il est important de vérifier l'intégrité de la nanoparticule. Dans notre cas, l'ajout de hyaluronate n'a pas provoqué de relargage de siRNA, prouvant de ce fait, la stabilité des nanoparticules.

En présence de sérum, l'augmentation de la taille est plus modérée pour les polyplexes contenant du hyaluronate (Figure III.4). La plus faible augmentation de la taille est cependant observée pour les polyplexes P-G-M + HA 5, mais leur taille reste plus élevée que celle des P-G-M + HA 12,5, à cause de leur diamètre plus important dans le tampon (Figure III.3). En raison de leur charge de surface positive qui favorise les interactions avec les protéines, les polyplexes P-G-M présentent quant à eux la plus grande augmentation de la taille, probablement due à un phénomène d'agrégation, souvent décrit dans la littérature pour des nanoparticules cationiques et déjà observé au chapitre II [19]. L'ajout de hyaluronate semble quant à lui limiter les interactions avec les protéines, et ce, probablement grâce à la charge négative et l'encombrement stérique apportés à la surface des polyplexes [10].

Les résultats de la Figure III.5 semblent indiquer que la présence de 5 % de hyaluronate sodique n'interfère pas avec l'entrée cellulaire dans un milieu sans sérum, malgré la modification de la charge de la nanoparticule vers une valeur négative. En effet, la surface cationique des polyplexes P-G-M devrait permettre une interaction optimale avec les membranes chargées négativement [20]. Les polyplexes P-G-M + HA 5, possédant une surface anionique, gardent cependant le même niveau de pénétration cellulaire, probablement grâce à l'interaction du hyaluronate avec le récepteur membranaire CD44 [3, 6]. Par contre, la plus faible entrée cellulaire des polyplexes P-G-M + HA 12,5 est peut-être due au potentiel zêta plus fortement négatif, augmentant les forces de répulsions entre les polyplexes et les membranes plasmiques, qui ne seraient plus suffisamment compensées par les interactions avec le récepteur CD44 [21]. L'équipe de Wojcicki suggère de façon similaire qu'en raison d'un encombrement stérique, une trop grande quantité d'acide hyaluronique en surface des nanoparticules pourrait diminuer l'interaction avec le récepteur CD44 [9].

En présence de 10 % de sérum, la pénétration cellulaire des polyplexes P-G-M + HA 5 et 12,5 ne diminue pas significativement (le MFI passe respectivement de 238 ± 21 à 216 ± 21 et de 101 ± 36 à 46 ± 14). Au contraire, celle des polyplexes P-G-M est fortement diminuée en

présence de sérum (le MFI passe de 228 ± 32 à 45 ± 12). Ceci peut s'expliquer par les mesures de taille qui montrent une augmentation du diamètre de moins de 100 nm pour les polyplexes P-G-M + HA 5 et 12,5, probablement synonyme d'une faible interaction avec les protéines du sérum. La surface de ces polyplexes ne semble pas masquée et ceux-ci peuvent interagir avec les membranes cellulaires [22, 23]. Par contre, l'entrée cellulaire des polyplexes P-G-M diminue significativement, à cause de la formation de la couronne de protéines sériques attestée par l'augmentation de leur taille (Figure III.4).

Pour toutes les formulations, la capacité des polyplexes à entrer dans les cellules diminue avec l'augmentation du pourcentage de sérum (Figure III.5). À partir de 50 % de sérum, la présence de hyaluronate ne semble plus suffisante pour empêcher la formation de la couronne de protéines, celles-ci étant présentes en grande quantité dans le milieu. Dans ces conditions, les polyplexes P-G-M + HA 5 présentent le MFI le plus élevé (102 ± 5). Toutefois celui-ci est deux fois plus faible qu'en l'absence de sérum ou qu'en présence de 10 %.

Alors que dans l'Opti-MEM[®], les polyplexes P-G-M et P-G-M + HA 5 pénètrent dans les cellules avec la même intensité (MFI semblables), l'efficacité des P-G-M + HA 5 est toutefois plus faible (32 % de diminution de l'expression de l'ARNm après deux cycles de transfection). Cette diminution d'efficacité causée par l'ajout de hyaluronate est semblable à celle observée lors de l'utilisation des polymères polycarbonates PEGylés, où, malgré une bonne entrée cellulaire, l'efficacité est fortement diminuée [11]. La diminution d'efficacité peut être due à des modifications de mécanismes intracellulaires plus complexes, comme une diminution de la libération des polyplexes des endosomes [24]. Contrairement à la membrane cytoplasmique, la membrane endosomale n'exprime pas le récepteur CD44, ce qui limite les interactions des polyplexes P-G-M + HA 5 avec cette membrane. Aussi, il est possible que les polyplexes P-G-M + HA 5 ne pénètrent pas aussi bien dans les cellules que les P-G-M et restent liés à la membrane, en dépit de l'observation d'un MFI élevé. En effet, la cytométrie en flux ne nous permet pas de savoir si les polyplexes sont effectivement entrés dans les cellules, ou si ceux-ci se trouvent liés à la membrane extracellulaire. Les résultats obtenus peuvent surestimer l'entrée cellulaire et doivent donc être interprétés avec prudence. Pour connaître réellement l'entrée cellulaire des polyplexes, une solution pourrait être l'utilisation de bleu de trypan qui permet d'éteindre la fluorescence due au siRNA lié à la membrane [5, 25]. Finalement, en raison de leur taille proche de 400 nm, ces polyplexes peuvent emprunter une autre voie d'entrée que les nanoparticules proches de 200 nm, modifiant leur devenir intracellulaire [26, 27].

Les polyplexes P-G-M, capables d'administrer le siRNA et diminuer l'expression de l'ARNm ciblé dans un milieu sans sérum, perdent toute efficacité en présence de 10 % ou 50 % de FBS (Figure III.6). Cette inefficacité peut en partie être expliquée par la diminution de leur pénétration cellulaire dans ces conditions (le MFI passe de 228 dans l'Opti-MEM[®], à 45 dans 10 % de FBS et à 11 dans 50 %) (Figure III.5). Une autre explication est que la couronne de protéines persiste autour du polyplexe après endocytose, modifiant le devenir intracellulaire des polyplexes. Wang et ses collaborateurs ont montré que la présence de cette couronne pouvait favoriser la dégradation des nanoparticules par les lysosomes [28]. Finalement, l'augmentation de la taille des polyplexes P-G-M dans le sérum pourrait aussi interférer avec les mécanismes impliquant leur endocytose [14].

En présence de sérum, aucune efficacité n'est observée pour les polyplexes P-G-M + HA 5. Malgré une entrée cellulaire similaire aux conditions sans sérum, ces polyplexes perdent leur efficacité après incubation dans 10 % de FBS. L'acide hyaluronique ne peut probablement pas empêcher l'adhésion d'un petit nombre de protéines en surface des polyplexes. Selon Wang et ses collaborateurs, la présence de ces protéines pourrait modifier le devenir intracellulaire des polyplexes et favoriser leur dégradation par les lysosomes [28].

III.5. CONCLUSIONS

L'ajout de hyaluronate sodique en surface des polyplexes P-G-M cationiques avait des objectifs multiples :

- (i) Conférer un encombrement stérique et une charge négative à la surface des nanoparticules. Ces modifications de surface ont pour but de limiter les interactions avec les protéines et donc augmenter la stabilité et les propriétés furtives après administration IV ;
- (ii) Favoriser l'endocytose et permettre un ciblage actif de la tumeur grâce à l'interaction avec le récepteur CD44 ;
- (iii) Conserver une entrée cellulaire élevée combinée à une efficacité de dégradation de l'ARNm, et ce, malgré la présence de sérum.

Dans cette étude préliminaire, les résultats montrent que le hyaluronate sodique utilisé pour recouvrir la surface cationique des polyplexes P-G-M apporte deux avantages évidents. Le premier avantage est que la stabilité de la taille en présence de sérum est améliorée grâce à

une diminution des interactions avec les protéines. Le second avantage est que, grâce au hyaluronate sodique ajouté à 5 %, l'entrée cellulaire dans un milieu riche en protéine est plus importante que pour les polyplexes P-G-M.

Cependant, ces polyplexes présentent aussi un inconvénient majeur. En effet, quel que soit le pourcentage de HA, ceux-ci ne présentent pas d'efficacité significative sur l'expression relative de l'ARNm HDAC5. Les raisons de cette perte d'efficacité sont probablement multiples. Parmi celles-ci, la taille élevée des polyplexes, une adhésion en surface des cellules ou un mauvais relargage de l'endosome sont des pistes d'exploration.

Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence l'intérêt de l'acide hyaluronique dans cette étude préliminaire, celui-ci semble cependant une alternative prometteuse à la PEGylation, grâce à sa biocompatibilité et sa furtivité, combinées à ses propriétés de ligand d'adressage [3]. Son utilisation en combinaison avec des polyplexes polycarbonates doit être optimisée. Par exemple, une seule masse moléculaire de hyaluronate a été investiguée dans le cadre de cette étude (151 – 300 kDa) alors qu'il pourrait s'agir d'un paramètre ayant une influence importante sur l'efficacité des polyplexes. Qhatal et son équipe montrent en effet dans leurs travaux que la masse moléculaire de l'acide hyaluronique modifie les caractéristiques physico-chimiques des liposomes ainsi que leur pénétration cellulaire [29]. D'autres stratégies d'incorporation de l'acide hyaluronique pourraient aussi être envisagées, comme sa liaison covalente avec le polymère P-G-M. L'équipe de Wojcicki a en effet montré une meilleure efficacité lorsque l'acide hyaluronique était complexé au liposome par une liaison covalente [9].

III.6. RÉFÉRENCES

1. Wang, T., Upponi, J.R., Torchilin, V.P., *Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies*, Int J Pharm, 2012. **427**(1): 3-20.
2. Hama, S., Itakura, S., Nakai, M., Nakayama, K., Morimoto, S., Suzuki, S., *et al.*, *Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry*, J Control Release, 2015. **206**: 67-74.
3. Dosio, F., Arpicco, S., Stella, B., Fattal, E., *Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery*, Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: 204-236.
4. Dey, A., Koli, U., Dandekar, P., Jain, R., *Investigating behaviour of polymers in nanoparticles of Chitosan Oligosaccharides coated with Hyaluronic Acid*, Polymer, 2016. **93**: 44-52.
5. Ragelle, H., Riva, R., Vandermeulen, G., Naeye, B., Pourcelle, V., Le Duff, C.S., *et al.*, *Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency*, J Control Release, 2014. **176**: 54-63.
6. Yang, X.Y., Li, Y.X., Li, M., Zhang, L., Feng, L.X., Zhang, N., *Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer*, Cancer Lett, 2013. **334**(2): 338-345.
7. Picaud, L., Thibault, B., Mery, E., Ouali, M., Martinez, A., Delord, J.P., *et al.*, *Evaluation of the effects of hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose barrier on ovarian tumor progression*, J Ovarian Res, 2014. **7**: 40.

8. Sahlberg, S.H., Spiegelberg, D., Glimelius, B., Stenerlow, B., Nestor, M., *Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells*, PLoS One, 2014. **9**(4): e94621.
9. Dufay Wojcicki, A., Hillaireau, H., Nascimento, T.L., Arpicco, S., Taverna, M., Ribes, S., *et al.*, *Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: physico-chemical characterization and in vitro targeting of the CD44 receptor*, J Control Release, 2012. **162**(3): 545-552.
10. Ravar, F., Saadat, E., Gholami, M., Dehghankelishadi, P., Mahdavi, M., Azami, S., *et al.*, *Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation*, J Control Release, 2016. **229**: 10-22.
11. Frère, A., Baroni, A., Hendrick, E., Delvigne, A.-S., Orange, F., Peulen, O., *et al.*, *PEGylated and functionalized aliphatic polycarbonate polyplex micelles for intravenous administration of HDAC5 siRNA in cancer therapy*, in preparation.
12. Frère, A., Kawalec, M., Tempelaar, S., Peixoto, P., Hendrick, E., Peulen, O., *et al.*, *Impact of the Structure of Biocompatible Aliphatic Polycarbonates on siRNA Transfection Ability*, Biomacromolecules, 2015. **16**(3): 769-779.
13. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*, Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(1): 1-9.
14. Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., *Endocytosis of nanomedicines*, J Control Release, 2010. **145**(3): 182-195.
15. Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*, Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): 941-951.
16. Kapoor, M., Burgess, D.J., *Cellular uptake mechanisms of novel anionic siRNA lipoplexes*, Pharm Res, 2013. **30**(4): 1161-1175.
17. Lee, S.Y., Huh, M.S., Lee, S., Lee, S.J., Chung, H., Park, J.H., *et al.*, *Stability and cellular uptake of polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) complexes for efficient gene silencing*, J Control Release, 2010. **141**(3): 339-346.
18. Bansal, R., Singh, A.K., Gandhi, R.P., Pant, A.B., Kumar, P., Gupta, K.C., *Galactomannan-PEI based non-viral vectors for targeted delivery of plasmid to macrophages and hepatocytes*, Eur J Pharm Biopharm, 2014. **87**(3): 461-471.
19. Dakwar, G.R., Zagato, E., Delanghe, J., Hobel, S., Aigner, A., Denys, H., *et al.*, *Colloidal stability of nano-sized particles in the peritoneal fluid: towards optimizing drug delivery systems for intraperitoneal therapy*, Acta Biomater, 2014. **10**(7): 2965-2975.
20. Favretto, M.E., Wallbrecher, R., Schmidt, S., van de Putte, R., Brock, R., *Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players?*, J Control Release, 2014. **180**: 81-90.
21. Ding, H.M., Ma, Y.Q., *Controlling cellular uptake of nanoparticles with pH-sensitive polymers*, Sci Rep, 2013. **3**: 2804-2816.
22. Dakwar, G.R., Braeckmans, K., Demeester, J., Ceelen, W., Smedt, S.C.D., Remaut, K., *Disregarded Effect of Biological Fluids in siRNA Delivery: Human Ascites Fluid Severely Restricts Cellular Uptake of Nanoparticles*, ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(43): 24322-24329.
23. Fleischer, C.C., Payne, C.K., *Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes*, Acc Chem Res, 2014. **47**(8): 2651-2659.
24. Majzoub, R.N., Chan, C.L., Ewert, K.K., Silva, B.F., Liang, K.S., Jacovetty, E.L., *et al.*, *Uptake and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome-DNA complexes with and without RGD-tagging*, Biomaterials, 2014. **35**(18): 4996-5005.
25. Wytrwal, M., Leduc, C., Sarna, M., Goncalves, C., Kepczynski, M., Midoux, P., *et al.*, *Gene delivery efficiency and intracellular trafficking of novel poly(allylamine) derivatives*, International Journal of Pharmaceutics, 2015. **478**(1): 372-382.
26. Xiang, S., Tong, H., Shi, Q., Fernandes, J.C., Jin, T., Dai, K., *et al.*, *Uptake mechanisms of non-viral gene delivery*, J Control Release, 2012. **158**(3): 371-378.
27. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*, Biochem J, 2004. **377**(Pt 1): 159-169.
28. Wang, F., Yu, L., Monopoli, M.P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A., *et al.*, *The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes*, Nanomedicine, 2013. **9**(8): 1159-1168.
29. Qhattal, H.S., Liu, X., *Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes*, Mol Pharm, 2011. **8**(4): 1233-1246.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif principal de cette thèse était de développer une formulation de polyplexes, à base de polymères polycarbonates aliphatiques et de siRNA. Ces polyplexes ont été développés dans le but de permettre au siRNA de franchir toutes les étapes nécessaires pour qu'il puisse exercer son activité antitumorale après une administration par la voie IV (Figure 21).

Les polycarbonates aliphatiques gagnent une attention croissante pour la délivrance de matériel génétique, grâce à leurs propriétés biocompatibles et biodégradables [1-4]. Au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré la possibilité d'utiliser ces polymères pour administrer de l'ADN ou du siRNA *in vitro*, en fonctionnalisant le squelette de polycarbonate aliphatique avec diverses fonctions cationiques [5-8]. Cependant, aucune étude à ce jour ne montre d'activité *in vivo*.

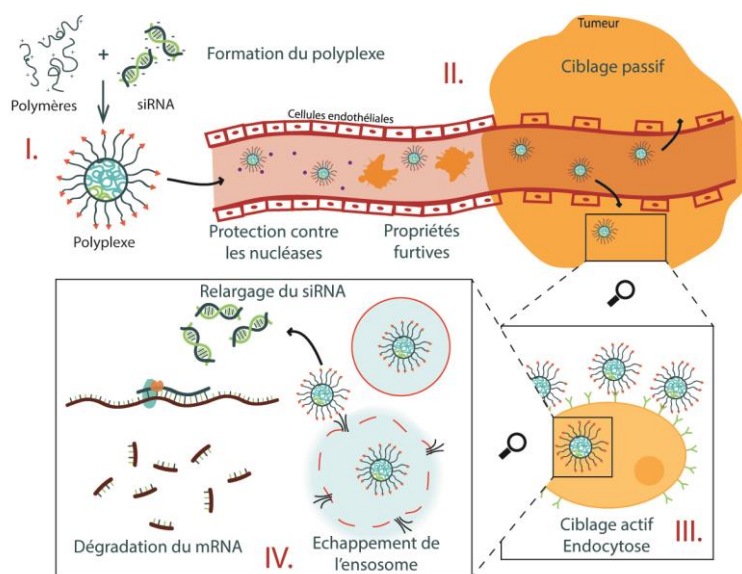


Figure 21. Différentes étapes que les polyplexes doivent franchir avant d'obtenir une efficacité thérapeutique *in vivo*. I : Formation des polyplexes possédant des caractéristiques physico-chimiques adéquates. II : Protection du siRNA contre la dégradation par les nucléases et furtivité des polyplexes par rapport au système immunitaire. III : Ciblage de la tumeur (passif et/ou actif) et endocytose par les cellules cibles. IV : Libération de l'endosome, relargage du siRNA et dégradation de l'ARNm, menant à la diminution de l'expression de la protéine.

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence de la structure des polycarbonates ainsi que la présence de PEG ou d'acide hyaluronique sur les paramètres physico-chimiques des polyplexes et sur leurs capacités à franchir les étapes nécessaires à l'administration du siRNA.

I. LES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES

Tableau 4. Récapitulatif des paramètres physico-chimiques obtenus dans un tampon TE de pH 7,5 pour les différentes formulations de polyplexes (/ : paramètre non déterminé ; moyenne \pm SD).

Polyplexe	Complexation du siRNA (%)	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)	Stabilité dans le tampon
P-G-M	100,4 \pm 0.4	223 \pm 18	11,2 \pm 0,9	-
P-G-M-PEG ₇₅₀	97,8 \pm 0.6	151 \pm 20	8,2 \pm 1,1	+
P-G-M-PEG ₂₀₀₀	100,0 \pm 0.1	150 \pm 25	5,0 \pm 0,9	++
P-G-M + HA 5	100,1 (n=1)	396 \pm 81	-14,8 \pm 3,8	/
P-G-M + HA 12,5	99,46 (n=1)	224 \pm 31	-23,6 \pm 0,1	/

I.1. LE NIVEAU DE COMPLEXATION DU siRNA

Nous avons observé que le niveau de complexation du siRNA, évalué par électrophorèse sur gel d'agarose ou grâce au réactif RiboGreen[®], est influencé par divers paramètres, comme le niveau d'ionisation du polymère ou sa masse moléculaire.

En effet, la densité de charges positives présente sur la structure du polymère joue un rôle important dans la complexation du siRNA [9]. Dans notre cas, lorsque la structure du polymère ne comporte que des fonctions morpholines, le polymère n'est pas en mesure de complexer le siRNA pour former des polyplexes. En effet, le pKa des fonctions morpholines, ne permet pas leur ionisation au pH de préparation des polyplexes (pH 7,5) [10, 11]. Par contre, nous avons observé que la présence de groupements guanidines, grâce à leur pKa d'environ 12,5, apporte une charge positive au polymère à pH 7,5. Cette charge permet la complexation du siRNA et la formation de polyplexes [7]. Les polymères contenant des fonctions guanidines ou un mélange de fonctions guanidine et morpholine possèdent le caractère cationique nécessaire à la complexation du siRNA.

De plus, outre le degré d'ionisation du polymère, sa masse moléculaire joue aussi un rôle dans la complexation du siRNA. Différents auteurs ont montré l'influence de la masse moléculaire des

polymères sur leur capacité à former des polyplexes [12, 13]. Par exemple, Liu et ses collaborateurs ont montré que les polymères de chitosan d'une masse moléculaire inférieure à ~10 kDa ne sont pas capables de complexer le siRNA et de former des particules stables, malgré une densité élevée de charges positives [13]. Gary *et al.* ont montré que la cohésion entre des polymères de faible masse moléculaire n'est pas suffisante pour complexer le siRNA [14]. Dans le cadre des polymères polycarbonates testés, nous avons montré qu'une masse moléculaire d'environ 10 kDa était nécessaire pour que le polymère puisse lier totalement le siRNA. En dessous de cette masse moléculaire, la plupart des polymères ne complexent que partiellement le siRNA quel que soit le rapport N/P.

Pour pouvoir complexer totalement le siRNA, les polymères polycarbonates doivent donc contenir **suffisamment de fonctions chargées positivement au pH de préparation** et doivent avoir une **masse moléculaire supérieure à ~10 kDa**.

I.2. LA TAILLE

Pour pouvoir être administrés par la voie IV, le diamètre des polyplexes, déterminé par DLS ou par MET, doit idéalement se situer entre 50 et 300 nm. D'un côté, cette taille leur permet de limiter leur élimination de l'organisme. Les nanoparticules trop petites peuvent être filtrées par le glomérule et excrétées par les reins [15] tandis que les plus grosses seront capturées par le foie et phagocytées par les cellules de Kupffer [15, 16]. D'un autre côté, les nanoparticules de cette taille peuvent s'accumuler préférentiellement au niveau tumoral grâce à l'effet EPR [17, 18].

Parmi les polymères polycarbonates testés, certains forment des polyplexes d'une taille favorable entre 50 et 300 nm au ratio N/P optimal, tandis que d'autres forment des nanoparticules de diamètre plus élevé, jusqu'à plus de 800 nm. Cependant, il est difficile d'établir un lien entre la structure du polymère polycarbonate et les différences de tailles observées entre les formulations. Les polyplexes formés avec le polymère amphiphile *Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM (P-G-M), sélectionné pour son efficacité *in vitro*, possèdent un diamètre idéal de 150 - 200 nm au N/P optimal.

Les analogues PEGylés du polymère P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀ forment des polyplexes de taille semblable. L'ajout d'une chaîne de PEG à la structure du polymère polycarbonate ne modifie donc pas significativement la taille des nanoparticules par rapport aux polyplexes formés par le polymère P-G-M utilisé dans le chapitre I (proche de 150 nm).

Différents auteurs ont également démontré que la présence de PEG n'influçait pas ou très peu le diamètre de leurs nanoparticules [19, 20].

Avec l'ajout de 5 % de hyaluronate sodique, les polyplexes P-G-M voient leur taille augmenter de presque deux fois. De manière similaire, Wojcicki et son équipe ont en effet observé que des interactions électrostatiques entre les liposomes testés et 10 % de hyaluronate sodique augmentaient la taille des nanoparticules, dont le diamètre passait d'environ 250 nm à 400 nm. Par contre, lorsque le hyaluronate était conjugué de façon covalente au DOPE avant de formuler les lipoplexes, ceux-ci conservaient un diamètre proche des 250 nm [21]. Cependant, l'addition de 12,5 % de hyaluronate sodique ne modifie pas la taille des polyplexes P-G-M. Cela pourrait être expliqué par une meilleure condensation de l'acide hyaluronique à la surface des polyplexes, à cette concentration plus élevée.

L'ajout de **PEG de modifie pas la taille** des polyplexes polycarbonate, mais l'addition de **hyaluronate sodique** par interactions électrostatiques **peut provoquer une augmentation du diamètre** en fonction du pourcentage ajouté.

I.3. LA CHARGE DE SURFACE

La charge de surface influence les interactions avec les membranes plasmiques, mais aussi avec les constituants sanguins comme les protéines [22]. De plus, il est connu qu'une charge fortement positive augmente la toxicité des nanoparticules [23]. Par exemple, Shao et ses collaborateurs ont montré l'influence de quatre types de nanoparticules polymériques de taille similaire, mais de potentiel zêta différent, variant de -30 à + 40 mV, sur la cytotoxicité et le taux d'endocytose. Ils montrent que la cytotoxicité et la pénétration cellulaire sont toutes les deux plus élevées pour les particules chargées positivement, et ce proportionnellement au potentiel zêta [23]. Au N/P optimal, la plupart des polyplexes étudiés possèdent un potentiel zêta légèrement positif, théoriquement suffisant pour interagir avec les membranes plasmiques, tout en limitant la toxicité et les interactions avec les protéines.

Dans notre travail, nous avons montré que l'ajout de PEG à la structure du polymère diminue le potentiel zêta proportionnellement à la longueur de la chaîne de PEG, celui-ci restant toutefois positif. La diminution de la charge de surface s'explique par le masquage partiel des charges de surface de la nanoparticule. D'autres auteurs, comme Vader et ses collaborateurs, ont montré des résultats semblables, avec une diminution de la charge de surface proportionnelle à la densité du PEG autour de la nanoparticule [24].

Grâce à son caractère anionique, le hyaluronate sodique est lui capable de se lier par interaction de charge à la surface cationique du polymère P-G-M. Il permet aussi l'obtention de nanoparticules possédant surface anionique, en fonction du pourcentage de hyaluronate. Un potentiel zêta négatif devrait théoriquement limiter les interactions avec les protéines, mais aussi avec les membranes cellulaires. Cependant, l'acide hyaluronique a la capacité d'interagir avec le récepteur CD44, pouvant favoriser l'endocytose sélective grâce à ce récepteur et ainsi contrebalancer la diminution d'affinité pour les membranes cellulaires due à la charge négative [25]. Wojcicki et ses collaborateurs ont préparé des liposomes recouverts de hyaluronate. Ceux-ci montraient une stabilité intéressante dans le sérum. De plus, malgré le potentiel zêta négatif des liposomes, qui pourrait diminuer l'interaction avec les membranes, leur entrée cellulaire était importante grâce à leur interaction avec le récepteur membranaire CD44 [21].

En résumé, **l'ajout de PEG diminue la charge de surface** des polyplexes, et ce, proportionnellement à la longueur de la chaîne. Cette charge **reste cependant positive**. Quant à l'addition d'**acide hyaluronique**, elle provoque une **modification du potentiel zêta vers des valeurs négatives**, proportionnellement à la quantité d'acide hyaluronique ajoutée.

I.4. LA STABILITÉ

La stabilité d'une dispersion de polyplexes peut être améliorée grâce aux répulsions de charge (plus le potentiel zêta est proche de la neutralité, moins une dispersion de polyplexes sera stable) ou grâce à des répulsions stériques entre les nanoparticules. En effet, les polyplexes P-G-M, d'une charge de surface d'environ +11 mV, possèdent une faible stabilité colloïdale, montrant une augmentation de leur diamètre après quelques heures, probablement due à leur agrégation. Par contre, malgré une diminution de leur charge de surface, les polyplexes P-G-M PEGylés montrent une meilleure stabilité, supérieure pour les polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ que les P-G-M-PEG₇₅₀. Cette augmentation de stabilité est due aux répulsions stériques apportées par le PEG, et ce proportionnellement à la longueur de la chaîne et à la densité du PEG [26], comme cela fut démontré par l'équipe de Steele [27].

Pour une stabilité à plus long terme, les polyplexes ont été lyophilisés. Ils ont ensuite été **conservés sous vide à -18°C pendant 3 mois** avant de vérifier leur stabilité. L'incorporation du siRNA, leur taille et leur potentiel zêta ne semblent pas être affectés par cette méthode de conservation qui semble donc être la plus adaptée pour une conservation à long terme, telle que le nécessite un produit pharmaceutique [28, 29].

II. LES CONTRAINTES LIÉES À L'ADMINISTRATION IV

II.1. L'ADSPORTION DES PROTÉINES PLASMATIQUES

Tableau 5. Récapitulatif des paramètres physico-chimiques obtenus en présence de sérum pour les différentes formulations de polyplexes (/ : paramètre non déterminé ; moyenne \pm SD ou valeur moyenne).

Polyplexe	Complexation du siRNA (%)	Taille (DLS) (nm)	Taille (fSPT) (nm)
	(50 % FBS, 3 h)	(10 % FBS, 3 h)	(10 % FBS, 3 h)
P-G-M	± 50	635 ± 33	± 425
P-G-M-PEG ₇₅₀	± 50	441 ± 1	± 275
P-G-M-PEG ₂₀₀₀	± 50	378 ± 127	± 450
P-G-M + HA 5	/	492 ± 88	/
P-G-M + HA 12,5	/	359 ± 29	/

Au contact des constituants sanguins, les nanoparticules cationiques peuvent interagir avec les protéines plasmatiques qui forment une couronne de protéines. Afin de limiter cette adsorption, du PEG a été ajouté à la structure du polymère P-G-M, et le comportement de ces polymères PEGylés en présence de protéines a été comparé à celui du polymère P-G-M. Par ITC, nous avons pu mettre en évidence une faible interaction entre les polyplexes, PEGylés ou non, et l'albumine, utilisée comme protéine plasmatique modèle. Ces trois formulations ont aussi été comparées quant à leur stabilité en présence de sérum, au niveau du relargage du siRNA (déterminé par FCS) et de l'évolution de leur taille (DLS ou fSPT). En comparaison avec la fSPT, la DLS a tendance à surévaluer la taille mesurée en milieu complexe, car la présence d'un petit nombre de particules de diamètre élevé modifie fortement le diamètre moyen vers des valeurs plus élevées. En termes de stabilité, ces techniques de FCS, DLS et fSPT montrent aussi des résultats comparables, aussi bien pour les polyplexes P-G-M que pour les P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀. Seule la taille des polyplexes P-G-M-PEG₇₅₀ reste inférieure à 300 nm. La taille des polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ augmente avec l'ajout de sérum (450 nm), mais reste stable entre 1 heure et 3 heures. Par contre, la taille des polyplexes P-G-M augmente au cours du temps (double voire triple), probablement à cause d'un phénomène d'agrégation, menant à la formation de nanoparticules d'environ 425 nm. Cette agrégation reste cependant modérée par rapport à d'autres nanoparticules cationiques de la littérature, dont le diamètre peut augmenter jusqu'à plus de cinq fois leur valeur initiale pour atteindre un diamètre final de plus de 1 μ m [30].

Malgré l'absence de PEG, les polyplexes P-G-M semblent présenter une interaction modérée avec les protéines. Une des raisons pourrait être la présence à la surface des polyplexes du bloc morpholine du polymère. Cette partie du polymère hydrophile, mais non chargée à pH neutre, pourrait jouer un rôle similaire à celui du PEG en formant une couche hydratée en surface des polyplexes, et diminuer ainsi leurs interactions avec les protéines [31].

Malgré la présence de PEG, les interactions avec les protéines persistent, bien que relativement faibles. La faible masse moléculaire des PEG utilisés (750 ou 2000 Da) pourrait en être la cause. En effet, les propriétés furtives des nanoparticules augmentent avec la densité de couverture et la longueur des chaînes de PEG [32]. Différents auteurs suggèrent qu'un recouvrement suffisant de la surface des nanoparticules est obtenu à partir d'une masse moléculaire de 2 kDa, mais que des propriétés furtives maximales sont atteintes à partir de 5 kDa [31, 33].

Dans notre cas, **l'utilisation de PEG n'apporte que peu d'avantages par rapport aux polyplexes non PEGylés quant à leurs interactions avec les protéines.**

L'acide hyaluronique a aussi été utilisé pour réduire les interactions avec les protéines, grâce au recouvrement de la surface des polyplexes. L'ajout d'acide hyaluronique modifie la charge de surface des polyplexes, qui devient négative. Cette charge négative et les répulsions stériques apportées par l'acide hyaluronique limitent théoriquement les interactions des polyplexes cationiques avec les protéines [25, 34, 35]. Dans notre étude, les polyplexes P-G-M recouverts de hyaluronate sodique (P-G-M + HA) présentent une augmentation de la taille en présence de sérum, mais celle-ci reste stable au cours du temps. Il faut noter que dans le cas des P-G-M + HA, la taille dans le sérum a été déterminée par DLS uniquement, ce qui peut donner une surestimation des valeurs observées, comme expliqué précédemment. Les résultats sont semblables à ceux obtenus avec les polyplexes PEGylés. L'acide hyaluronique limite les interactions avec les protéines, mais ne les inhibe pas totalement. L'utilisation d'acide hyaluronique de différentes masses moléculaires pourrait aussi améliorer la répulsion entre les polyplexes et les protéines [36].

En résumé, **l'adsorption des protéines plasmatiques est modérée**, mais présente pour toutes les formulations. Les polyplexes **non PEGylés** semblent **adsorber plus de protéines** que les polyplexes **PEGylés**.

II.2. LE CIBLAGE DE LA TUMEUR

Tableau 6. Récapitulatif de la biodistribution des polyplexes après administration par voie IV chez la souris (- : pas d'accumulation ; + : légère accumulation ; ++ : accumulation moyenne ; +++ : forte accumulation).

Polyplexe	Tumeur	Reins	Rate	Foie	Poumons	Coeur
P-G-M	+	++	+	+++	+++	-
P-G-M-PEG ₇₅₀	++	++	+	+++	+	-
P-G-M-PEG ₂₀₀₀	++	+	+	++	+	-

L'accumulation des polyplexes au niveau de la tumeur a été évaluée pour les polyplexes P-G-M, P-G-M-PEG₇₅₀ et P-G-M-PEG₂₀₀₀, après leur administration IV chez la souris. Grâce à leur diamètre nanométrique, les trois formulations présentent une accumulation au niveau de la tumeur, mais aussi au niveau d'autres organes comme le foie et la rate, comme souvent observé pour des nanoparticules de taille supérieure à 100 nm, puisque ces organes présentent également des fenestrations. De plus, vu que la présence de sérum provoque une augmentation de la taille pour les trois formulations (Tableau 5), cela favorise la capture par ces organes [15]. Les polyplexes P-G-M sont les seuls à montrer une accumulation au niveau pulmonaire, probablement causée par la présence d'agrégats de plus grande taille par rapport aux polyplexes PEGylés, trop importante pour passer dans les fins capillaires des poumons [15]. La présence de fluorescence dans les reins semble, elle, plutôt indiquer une excrétion du siRNA libre [37].

Pour améliorer le ciblage de la tumeur, différentes stratégies pourraient être utilisées. Premièrement, une diminution de la taille des polyplexes pourrait limiter l'accumulation dans le foie et la rate. Ces organes sont en effet capables de capturer une certaine proportion des nanoparticules d'un diamètre supérieur à 200 nm [15, 38]. Certains auteurs montrent d'ailleurs que le diamètre idéal pour favoriser le ciblage passif est de 100 nm [31, 39], voire de 50 nm pour les tumeurs hypovasculaires [40].

Une autre stratégie, qui pourrait être utilisée pour augmenter le ciblage, est le greffage de ligands à la surface des polyplexes, afin d'obtenir un ciblage actif et une augmentation de l'accumulation au niveau tumoral. Comme détaillé dans l'introduction (III.3.3.b), de nombreux ligands d'adressage peuvent être utilisés dans le cadre du cancer. Par exemple, Corbet et son équipe ont montré une meilleure accumulation tumorale des nanoparticules de chitosan

PEGylées lorsqu'elles comportaient un ligand d'adressage (peptide RGD reconnaissant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$). Grâce à la présence de ce ligand, les polyplexes de chitosan ont d'ailleurs montré une efficacité antitumorale significative *in vivo*, qui n'est pas observée pour les polyplexes PEGylés sans peptide RGD [41].

L'étude de la distribution *in vivo* nous a aussi indiqué que le siRNA s'accumulait au niveau tumoral dès 4 heures post-injection et persistait jusqu'à 24 heures après l'injection d'une dose de 1 mg/kg, habituellement utilisée *in vivo* [42, 43]. Cette indication nous permet d'envisager un schéma thérapeutique à une seule administration par jour dans le cadre d'une future étude d'efficacité antitumorale *in vivo* chez la souris.

En résumé, les polyplexes **non PEGylés et PEGylés** sont **capables d'atteindre la tumeur**. Cependant, ils s'accumulent aussi dans d'autres organes comme la **rate et le foie**. Les polyplexes **P-G-M** montrent une forte accumulation dans les **poumons**.

III. L'ENDOCYTOSE

Tableau 7. Récapitulatif des valeurs de MFI (entrée cellulaire) obtenues en l'absence ou en présence de sérum pour les différentes formulations de polyplexes (/ : paramètre non déterminé ; moyenne \pm SD ou valeur moyenne).

Polyplexe	Pénétration cellulaire (MFI)		
	0 % FBS	10 % FBS	50 % FBS
P-G-M	200 \pm 12	39 \pm 7	16 \pm 10
P-G-M-PEG ₇₅₀	266 \pm 24	13 \pm 1	2 \pm 1
P-G-M-PEG ₂₀₀₀	48 \pm 5	34 \pm 7	1 \pm 0
P-G-M + HA 5	238 \pm 21	215 \pm 80	103 \pm 3
P-G-M + HA 12,5	101 \pm 21	46 \pm 8	16 \pm 6

La capacité des polyplexes à pénétrer dans les cellules dépend principalement de leur taille et de leurs propriétés de surface [44]. Il est généralement reconnu qu'une charge de surface positive favorise les interactions avec les constituants anioniques des membranes plasmiques, nécessaires aux processus d'endocytose [45-47]. Dans ce travail, les polyplexes polycarbonates possédant une charge de surface positive au N/P optimal montraient, en effet, généralement une capacité élevée à entrer dans les cellules HeLa cultivées dans un milieu sans sérum, contrairement aux polyplexes de potentiel zêta négatif. Une exception était les polyplexes

contenant du hyaluronate sodique, capables d'entrer dans les cellules grâce à une interaction avec le récepteur CD44 [21].

L'ajout de PEG en surface des nanoparticules est connu pour masquer la surface des polyplexes vis-à-vis des protéines plasmatiques, mais aussi des membranes plasmiques. Le PEG peut diminuer les interactions avec les membranes et ainsi leur capacité à pénétrer dans les cellules, et ce proportionnellement à la densité de couverture et à sa masse moléculaire [48, 49]. Dans notre travail, nous avons observé qu'en l'absence de sérum, les polyplexes P-G-M-PEG₇₅₀ avaient un taux d'endocytose similaire à celui des polyplexes P-G-M non PEGylé. Par contre, le taux d'endocytose des polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ était significativement plus faible (environ 5 fois moins de siRNA par cellule).

Avec l'utilisation de hyaluronate sodique, la charge de surface des polyplexes devient négative. Cette charge négative devrait théoriquement augmenter la répulsion avec les membranes plasmiques et donc diminuer l'endocytose. Cependant, les cellules cancéreuses surexpriment le récepteur CD44 qui lie entre autres, l'acide hyaluronique. La présence de ce récepteur pourrait donc favoriser une endocytose spécifique des polyplexes recouverts d'acide hyaluronique [25]. En l'absence de sérum, nous avons en effet observé un taux d'endocytose similaire pour les polyplexes P-G-M + HA 5 et pour les polyplexes P-G-M seuls. Malgré la diminution de la charge de surface, le taux d'endocytose est maintenu potentiellement grâce aux interactions avec les récepteurs CD44. Par contre, l'ajout de 12,5 % de hyaluronate diminue environ de moitié le taux d'endocytose. La diminution plus importante du potentiel zêta apportée par l'ajout de 12,5 % de hyaluronate pourrait, en effet, augmenter les répulsions avec les membranes plasmiques. Dans ce cas, la diminution de la charge et de l'affinité pour les membranes n'est plus contrebalancée par l'affinité de l'hyaluronate pour le récepteur CD44. Dans la littérature, l'équipe de Wojcicki observe aussi une diminution de la pénétration cellulaire due à l'augmentation du pourcentage d'acide hyaluronique. Leur hypothèse est que la quantité d'acide hyaluronique présentée aux cellules est trop importante pour permettre une interaction optimale avec le récepteur CD44, et ce, en raison d'un encombrement stérique [21].

En présence de sérum, les propriétés de surface des polyplexes peuvent être modifiées par l'adsorption de protéines, ce qui peut diminuer, voire totalement supprimer la capacité des polyplexes à pénétrer dans les cellules [50, 51]. L'ajout de PEG ou de hyaluronate sodique devrait limiter cette adsorption et donc limiter la diminution de la pénétration cellulaire.

Cependant, dans notre cas, le PEG n'empêche pas la diminution de l'entrée cellulaire en présence de sérum. L'équipe de Dakwar a montré aussi que la présence de PEG autour de liposomes cationiques ne leur permettait pas de pénétrer dans les cellules cultivées dans un milieu riche en protéines. Pourtant, ces mêmes liposomes pénètrent dans les cellules cultivées dans un milieu sans sérum. Ils suggèrent donc que cette diminution de pénétration cellulaire est due à la formation de la couronne de protéines et ce, malgré la présence de PEG [30]. D'autres auteurs comme l'équipe de Yang montrent cependant une pénétration cellulaire importante pour des polyplexes polycarbonate PEGylés en présence de sérum. Une des différences qui pourrait expliquer cette pénétration cellulaire est que le polymère de Yang comprend une chaîne de PEG comprise entre deux blocs hydrophiles. Cette différence de structure pourrait expliquer la meilleure entrée cellulaire de leurs polyplexes en présence de sérum. Selon cette équipe, la configuration des polyplexes avec ce polymère permet la présence de groupements cationiques aux extrémités des chaînes de PEG, favorisant les interactions avec les membranes [8].

Concernant les polyplexes recouverts de 5 % d'acide hyaluronique, leur pénétration cellulaire diminue plus modérément avec l'augmentation du pourcentage de sérum. En présence de 50 % de sérum, la pénétration de ces polyplexes est plus élevée que pour toutes les autres formulations. La charge de surface négative apportée par hyaluronate semble limiter la formation de la couronne de protéines, et ainsi limiter le masquage de la surface de la nanoparticule [30, 51].

Outre l'utilisation d'acide hyaluronique, d'autres stratégies pourraient être utilisées pour améliorer la pénétration cellulaire en présence d'un milieu riche en protéines. Par exemple, il serait intéressant de tester des polycarbonates dont la liaison entre le PEG et le reste du polymère serait clivable en présence d'un stimulus de l'environnement tumoral, comme une liaison hydrazone sensible au pH acide, tel que fréquemment observé dans les tumeurs. Le PEG, nécessaire pour garantir l'intégrité du polyplexe jusqu'à la tumeur, serait libéré lorsque la nanoparticule atteint l'environnement tumoral. La charge de surface positive est ainsi exposée pour favoriser la pénétration cellulaire [52]. Cependant, la matrice extracellulaire contient aussi de nombreux constituants, tels que des protéines, qui pourraient interagir avec la surface cationique des polyplexes, une fois celle-ci exposée.

En résumé, l'ajout de **PEG₇₅₀** ou de **HA 5 % ne diminue pas** l'entrée cellulaire des polyplexes **P-G-M en l'absence de sérum**, contrairement au **PEG₂₀₀₀** ou à l'**HA 12,5 %**, dont l'encombrement stérique est trop important. Le « dilemme du PEG » est mis en évidence dans

ce travail. Pour combiner furtivité et efficacité, Un compromis pourrait théoriquement être trouvé en modulant la densité de couverture et la longueur des chaînes de PEG. Un compromis similaire semble aussi nécessaire avec l'utilisation de l'acide hyaluronique.

En **présence de sérum**, l'entrée **diminue** drastiquement pour **toutes les formulations**, sauf pour les polyplexes **P-G-M + HA 5**, dont la diminution est moins importante.

IV. LA LIBÉRATION DE L'ENDOSOME ET LA DÉGRADATION DE L'ARNM

Tableau 8. Récapitulatif des valeurs d'efficacité (expression relative de l'ARNm HDAC5) obtenues après deux cycles de transfection, en l'absence ou en présence de sérum, pour les différentes formulations de polyplexes (/ : paramètre non déterminé ; moyenne \pm SD).

Polyplexe	Expression relative de l'ARNm HDAC5 (%)		
	0 % FBS	10 % FBS	50 % FBS
P-G-M	19 \pm 8	107 \pm 13	88 \pm 14
P-G-M-PEG ₇₅₀	79 \pm 10	/	/
P-G-M-PEG ₂₀₀₀	52 \pm 6	/	/
P-G-M + HA 5	68 \pm 12	109 \pm 13	94 \pm 16
P-G-M + HA 12,5	/	/	/

La libération de l'endosome est une étape cruciale pour l'efficacité du siRNA. En effet, une pénétration cellulaire élevée des polyplexes n'est pas nécessairement associée à une bonne efficacité. La première stratégie pour augmenter la libération de l'endosome a été l'utilisation du mécanisme « d'éponge à protons ». En augmentant la proportion de groupements morpholines, nous avons montré que le pouvoir tampon du polymère augmente pour atteindre celui du PEI lorsque le rapport morpholine/guanidine est égal à 1. Malgré un pouvoir tampon similaire à celui du PEI, les premiers polyplexes développés n'étaient toutefois pas capables d'être libérés de l'endosome. Une explication serait que les polyplexes sont bien libérés de l'endosome, mais une fois dans le cytoplasme, le siRNA n'est pas relargué du polymère.

Pour délivrer du siRNA, l'équipe de Hedrick et Wender ont synthétisé des polymères polycarbonates contenant des groupements hydrophobes sur leur structure, et ont montré l'importance de l'association entre ce groupement et le bloc hydrophile pour administrer efficacement le siRNA [7]. En s'inspirant de leur travail, l'addition d'un bloc hydrophobe de polycarbonate sur la structure du polymère nous a permis d'obtenir une diminution de

l'expression de l'ARNm ciblé. Selon la littérature, le caractère amphiphile du polymère P-G-M (*Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM) permet de perturber les membranes et de favoriser la libération de l'endosome. L'interaction du polymère avec les membranes pourrait aussi déstructurer les polyplexes et permettre le relargage du siRNA [53-56]. La dégradation de l'ARNm codant pour la protéine HDAC5 par le siRNA, après deux cycles de transfection, mène finalement à une diminution de la prolifération des cellules HCT116 *in vitro*.

Par contre, ces polyplexes *Bz*-PTMC-*b*-PCG-*b*-PCM ne montrent aucune efficacité *in vitro* lorsque les cellules sont transfectées en présence de sérum. Différentes hypothèses peuvent expliquer cette inefficacité. Premièrement, l'entrée cellulaire est fortement diminuée en présence de sérum. Deuxièmement, l'augmentation de la taille observée pour ces polyplexes dans le sérum pourrait modifier les mécanismes d'endocytose [44]. En empruntant une autre voie d'entrée, la vésicule d'endocytose pourrait par exemple ne pas subir d'acidification. Celle-ci est pourtant nécessaire aux polyplexes pour être libérés de l'endosome grâce au mécanisme « d'éponge à protons ». L'équipe de Hoekstra a montré que des nanoparticules de moins de 200 nm empruntaient la voie d'endocytose clathrine-dépendante, menant à l'acidification de l'endosome. Par contre, des particules de plus de 500 nm empruntaient une voie d'entrée qui ne subissait pas d'acidification de la vésicule d'endocytose [57]. Finalement, une hypothèse suggérée par Wang et ses collaborateurs est que la formation d'une couronne de protéines autour des polyplexes pourrait diminuer leur libération de l'endosome et favoriser leur dégradation par les lysosomes [58].

L'efficacité des polyplexes PEGylés n'est par contre pas comparable à celle observée pour les polyplexes P-G-M. Il est établi que l'ajout de PEG en surface de polyplexes peut diminuer leur efficacité en fonction de leur densité et de leur longueur de chaîne. Dans notre cas, malgré une plus grande longueur de chaîne de PEG, les polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ montrent étonnamment une meilleure efficacité, induisant une dégradation de l'ARNm plus importante que celle observée avec les P-G-M-PEG₇₅₀. De plus, la pénétration cellulaire des polyplexes P-G-M-PEG₇₅₀ est similaire à celle des polyplexes non PEGylés, et est meilleure que celle des P-G-M-PEG₂₀₀₀. Une des raisons qui pourrait expliquer la plus grande efficacité des polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ est leur meilleur pouvoir tampon, directement lié au rapport morpholine/guanidine. En effet, celui-ci est plus élevé pour le polymère P-G-M-PEG₂₀₀₀ que pour le polymère P-G-M-PEG₇₅₀. Le pouvoir tampon du polymère peut favoriser la libération des polyplexes de l'endosome grâce au mécanisme « d'éponge à protons » et ainsi augmenter l'efficacité de dégradation de l'ARNm [59, 60]. Cependant, la diminution d'expression de 50 % de l'ARNm HDAC5 causée par deux

cycles de transfection par les polyplexes P-G-M-PEG₂₀₀₀ ne suffit pas à obtenir une diminution de prolifération des cellules cancéreuses. Malgré une diminution de 50 % de son niveau d'expression, il est possible que le niveau protéique d'HDAC5 restant soit suffisant pour maintenir une activité catalytique dans la cellule, lui permettant d'assurer ses fonctions.

En présence de sérum, l'efficacité de polyplexes PEGylés n'a pas été démontrée. Leur faible efficacité dans un milieu exempt de sérum en plus de leur faible pénétration cellulaire en présence de sérum laisse supposer d'une efficacité non significative *in vivo*, mais cela reste toutefois à démontrer.

L'acide hyaluronique avait pour objectif d'améliorer l'efficacité des polyplexes en présence de sérum. L'efficacité des polyplexes P-G-M + HA 5 dans un milieu sans sérum est toutefois faible et similaire à celle observée pour les polyplexes PEGylés. Les raisons de cette perte d'efficacité peuvent être diverses. Par exemple, il est possible que les polyplexes P-G-M + HA 5 restent liés à la membrane, et que cette fluorescence membranaire soit confondue avec la pénétration cellulaire lors de l'analyse de cytométrie. Dans ce cas, la cytométrie en flux donne une surestimation du niveau d'endocytose [61]. Aussi, la taille élevée des polyplexes P-G-M + HA 5 peut modifier leur voie d'entrée et leur devenir intracellulaire [44]. Finalement, pour l'entrée cellulaire, les interactions avec les membranes plasmiques sont favorisées par le récepteur CD44 [36], ce qui n'est pas le cas avec les membranes endosomales. La présence de hyaluronate peut donc entraver la libération de l'endosome, à cause de la charge de surface anionique des polyplexes.

En présence de sérum, les polyplexes P-G-M + HA 5 ne présentent plus aucune efficacité. En plus des hypothèses développées ci-dessus, une des raisons pourrait être une légère adsorption de protéines en surface des polyplexes, malgré la présence de hyaluronate. Selon l'équipe de Wang, ces protéines en surface pourraient favoriser la dégradation des polyplexes par les lysosomes [58].

En résumé, en **absence de sérum**, les polyplexes **P-G-M** montrent une efficacité suffisante pour obtenir une **diminution de la prolifération des cellules cancéreuses**. L'ajout de **PEG** et de **HA diminue cette efficacité**, provoquant la perte de l'effet antiprolifératif. En **présence de sérum**, **aucune formulation** ne montre une efficacité significative.

V. LA TOXICITÉ

Les différents tests de toxicité réalisés avec les polymères polycarbonates utilisés dans ce travail n'ont pas mis en évidence de toxicité. De plus, les polymères de type polycarbonates sont décrits dans la littérature comme étant biocompatibles et biodégradables [1-4]. Cependant, afin d'envisager une future utilisation clinique de nouveaux polymères, il sera nécessaire de déterminer et prouver leur caractère non toxique, biocompatible et biodégradable *in vitro*, mais aussi *in vivo*.

En plus de la toxicité intrinsèque du polymère, les polyplexes peuvent présenter une toxicité due à leurs propriétés nanoparticulaires. Ce domaine de la toxicité, appelé la nanotoxicité, n'est pas à négliger, surtout qu'il en est à ses débuts et que la toxicité à long terme de ce genre de traitement reste encore méconnue [62].

VI. RÉFÉRENCES

1. Mespouille, L., Coulembier, O., Kawalec, M., Dove, A.P., Dubois, P., *Implementation of metal-free ring-opening polymerization in the preparation of aliphatic polycarbonate materials*, Progress in Polymer Science, 2014. **39**(6): 1144-1164.
2. Chen, W., Meng, F., Cheng, R., Deng, C., Feijen, J., Zhong, Z., *Advanced Drug and Gene Delivery Systems Based on Functional Biodegradable Polycarbonates and Copolymers*, Journal of Controlled Release, 2014. **190**: 398-414.
3. Xu, J., Feng, E., Song, J., *Renaissance of Aliphatic Polycarbonates: New Techniques and Biomedical Applications*, J Appl Polym Sci, 2014. **131**(5): 39822.
4. Ong, Z.Y., Fukushima, K., Coady, D.J., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Rational design of biodegradable cationic polycarbonates for gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 120-126.
5. Dong, X., Tian, H., Chen, L., Chen, J., Chen, X., *Biodegradable mPEG-b-P(MCC-g-OEI) copolymers for efficient gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 135-142.
6. Seow, W.Y., Yang, Y.Y., *Functional polycarbonates and their self-assemblies as promising non-viral vectors*, Journal of Controlled Release, 2009. **139**(1): 40-47.
7. Geihe, E.I., Cooley, C.B., Simon, J.R., Kiesewetter, M.K., Edward, J.A., Hickerson, R.P., *et al.*, *Designed guanidinium-rich amphipathic oligocarbonate molecular transporters complex, deliver and release siRNA in cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): 13171-13176.
8. Yang, C., Ong, Z.Y., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Novel biodegradable block copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and cationic polycarbonate: effects of peg configuration on gene delivery*, Macromol Rapid Commun, 2011. **32**(22): 1826-1833.
9. Gary, D.J., Min, J., Kim, Y., Park, K., Won, Y.Y., *The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-Based siRNA Complexes*, Macromol Biosci, 2013. **13**(8): 1059-1071.
10. Kawalec, M., Dove, A.P., Mespouille, L., Dubois, P., *Morpholine-functionalized polycarbonate hydrogels for heavy metal ion sequestration*, Polymer Chemistry, 2013. **4**(4): 1260-1270.
11. Van Overstraeten-Schlogel, N., Shim, Y.H., Tevel, V., Piel, G., Piette, J., Dubois, P., *et al.*, *Assessment of new biocompatible poly(N-(morpholino)ethyl methacrylate)-based copolymers by transfection of immortalized keratinocytes*, Drug Deliv, 2012. **19**(2): 112-122.
12. Yu, H., Russ, V., Wagner, E., *Influence of the molecular weight of bioreducible oligoethylenimine conjugates on the polyplex transfection properties*, AAPS Journal, 2009. **11**(3): 445-455.
13. Liu, X., Howard, K.A., Dong, M., Andersen, M.O., Rahbek, U.L., Johnsen, M.G., *et al.*, *The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing*, Biomaterials, 2007. **28**(6): 1280-1288.
14. Gary, D.J., Puri, N., Won, Y.Y., *Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery*, J Control Release, 2007. **121**(1-2): 64-73.
15. Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*, Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): 941-951.
16. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*, Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(1): 1-9.
17. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*, Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): 271-284.
18. Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., *et al.*, *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): 4607-4612.
19. Ulasov, A.V., Khramtsov, Y.V., Trusov, G.A., Rosenkranz, A.A., Sverdlov, E.D., Sobolev, A.S., *Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy*, Mol Ther, 2011. **19**(1): 103-112.
20. Khargharia, S., Kizzire, K., Ericson, M.D., Baumhover, N.J., Rice, K.G., *PEG length and chemical linkage controls polyacridine peptide DNA polyplex pharmacokinetics, biodistribution, metabolic stability and in vivo gene expression*, J Control Release, 2013. **170**(3): 325-333.
21. Dufay Wojcicki, A., Hillaireau, H., Nascimento, T.L., Arpicco, S., Taverna, M., Ribes, S., *et al.*, *Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: physico-chemical characterization and in vitro targeting of the CD44 receptor*, J Control Release, 2012. **162**(3): 545-552.

22. Capriotti, A.L., Caracciolo, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Pozzi, D., Samperi, R., *et al.*, *Do plasma proteins distinguish between liposomes of varying charge density?*, J Proteomics, 2012. **75**(6): 1924-1932.
23. Shao, X.R., Wei, X.Q., Song, X., Hao, L.Y., Cai, X.X., Zhang, Z.R., *et al.*, *Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells*, Cell Prolif, 2015. **48**(4): 465-474.
24. Vader, P., Crielaard, B.J., van Dommelen, S.M., van der Meel, R., Storm, G., Schiffflers, R.M., *Targeted delivery of small interfering RNA to angiogenic endothelial cells with liposome-polycation-DNA particles*, J Control Release, 2012. **160**(2): 211-216.
25. Dosio, F., Arpicco, S., Stella, B., Fattal, E., *Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery*, Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: 204-236.
26. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*, Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(36): 6288-6308.
27. Steele, T.W., Zhao, X., Tarcha, P., Kissel, T., *Factors influencing polycation/siRNA colloidal stability toward aerosol lung delivery*, Eur J Pharm Biopharm, 2012. **80**(1): 14-24.
28. Kasper, J.C., Kuchler, S., Friess, W., *Lyophilization of synthetic gene carriers*, Methods Mol Biol, 2013. **948**: 133-147.
29. Fonte, P., Reis, S., Sarmiento, B., *Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery*, Journal of Controlled Release, 2016. **225**: 75-86.
30. Dakwar, G.R., Braeckmans, K., Demeester, J., Ceelen, W., Smedt, S.C.D., Remaut, K., *Disregarded Effect of Biological Fluids in siRNA Delivery: Human Ascites Fluid Severely Restricts Cellular Uptake of Nanoparticles*, ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(43): 24322-24329.
31. Beck-Broichsitter, M., Nicolas, J., Couvreur, P., *Design attributes of long-circulating polymeric drug delivery vehicles*, Eur J Pharm Biopharm, 2015. **97**(Pt B): 304-317.
32. Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L.M., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*, Adv Drug Deliv Rev, 2016. **99**(Pt A): 28-51.
33. Gref, R., Luck, M., Quéllec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., *et al.*, *'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2000. **18**(3-4): 301-313.
34. Ragelle, H., Riva, R., Vandermeulen, G., Naeye, B., Pourcelle, V., Le Duff, C.S., *et al.*, *Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency*, J Control Release, 2014. **176**: 54-63.
35. Ravar, F., Saadat, E., Gholami, M., Dehghankelishadi, P., Mahdavi, M., Azami, S., *et al.*, *Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation*, J Control Release, 2016. **229**: 10-22.
36. Qhattal, H.S., Liu, X., *Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes*, Mol Pharm, 2011. **8**(4): 1233-1246.
37. Zuckerman, J.E., Davis, M.E., *Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer*, Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(12): 843-856.
38. Tan, J., Shah, S., Thomas, A., Ou-Yang, H.D., Liu, Y., *The influence of size, shape and vessel geometry on nanoparticle distribution*, Microfluid Nanofluidics, 2013. **14**(1-2): 77-87.
39. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C., *Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles*, Molecular Pharmaceutics, 2008. **5**(4): 505-515.
40. Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., *et al.*, *Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size*, Nat Nanotechnol, 2011. **6**(12): 815-823.
41. Corbet, C., Ragelle, H., Pourcelle, V., Vanvarenberg, K., Marchand-Brynaert, J., Préat, V., *et al.*, *Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method*, Journal of Controlled Release, 2016. **223**: 53-63.
42. Zhao, Z.X., Gao, S.Y., Wang, J.C., Chen, C.J., Zhao, E.Y., Hou, W.J., *et al.*, *Self-assembly nanomicelles based on cationic mPEG-PLA-b-Polyarginine(R15) triblock copolymer for siRNA delivery*, Biomaterials, 2012. **33**(28): 6793-6807.
43. Cheng, Q., Huang, Y., Zheng, H., Wei, T., Zheng, S., Huo, S., *et al.*, *The effect of guanidinylation of PEGylated poly(2-aminoethyl methacrylate) on the systemic delivery of siRNA*, Biomaterials, 2013. **34**(12): 3120-3131.
44. Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., *Endocytosis of nanomedicines*, J Control Release, 2010. **145**(3): 182-195.

45. Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D., *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): 12349-12354.
46. Wender, P.A., Galliher, W.C., Goun, E.A., Jones, L.R., Pillow, T.H., *The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms*, Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(4-5): 452-472.
47. Favretto, M.E., Wallbrecher, R., Schmidt, S., van de Putte, R., Brock, R., *Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players?*, J Control Release, 2014. **180**: 81-90.
48. Wang, T., Upponi, J.R., Torchilin, V.P., *Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies*, Int J Pharm, 2012. **427**(1): 3-20.
49. Rabanel, J.M., Hildgen, P., Banquy, X., *Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation*, J Control Release, 2014. **185**: 71-87.
50. Hadjidemetriou, M., Al-Hmady, Z., Mazza, M., Collins, R.F., Dawson, K., Kostarelos, K., *In Vivo Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles*, ACS Nano, 2015. **9**(8): 8142-8156.
51. Fleischer, C.C., Payne, C.K., *Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes*, Acc Chem Res, 2014. **47**(8): 2651-2659.
52. Chen, D., Liu, W., Shen, Y., Mu, H., Zhang, Y., Liang, R., *et al.*, *Effects of a novel pH-sensitive liposome with cleavable esterase-catalyzed and pH-responsive double smart mPEG lipid derivative on ABC phenomenon*, Int J Nanomedicine, 2011. **6**: 2053-2061.
53. Liu, K.L., Goh, S.H., Li, J., *Controlled synthesis and characterizations of amphiphilic poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate]-poly(ethylene glycol)-poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate] triblock copolymers*, Polymer, 2008. **49**(3): 732-741.
54. Xiong, X.B., Uludag, H., Lavasanifar, A., *Biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polyesters with grafted polyamines as supramolecular nanocarriers for efficient siRNA delivery*, Biomaterials, 2009. **30**(2): 242-253.
55. Bishop, C.J., Kozielski, K.L., Green, J.J., *Exploring the role of polymer structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles*, J Control Release, 2015. **219**: 488-499.
56. Eltoukhy, A.A., Chen, D., Alabi, C.A., Langer, R., Anderson, D.G., *Degradable terpolymers with alkyl side chains demonstrate enhanced gene delivery potency and nanoparticle stability*, Adv Mater, 2013. **25**(10): 1487-1493.
57. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*, Biochem J, 2004. **377**(Pt 1): 159-169.
58. Wang, F., Yu, L., Monopoli, M.P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A., *et al.*, *The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes*, Nanomedicine, 2013. **9**(8): 1159-1168.
59. Frère, A., Kawalec, M., Tempelaar, S., Peixoto, P., Hendrick, E., Peulen, O., *et al.*, *Impact of the Structure of Biocompatible Aliphatic Polycarbonates on siRNA Transfection Ability*, Biomacromolecules, 2015. **16**(3): 769-779.
60. Shrestha, R., Elsbahy, M., Florez-Malaver, S., Samarajeewa, S., Wooley, K.L., *Endosomal escape and siRNA delivery with cationic shell crosslinked knedel-like nanoparticles with tunable buffering capacities*, Biomaterials, 2012. **33**(33): 8557-8568.
61. Wyrwal, M., Leduc, C., Sarna, M., Goncalves, C., Kepczynski, M., Midoux, P., *et al.*, *Gene delivery efficiency and intracellular trafficking of novel poly(allylamine) derivatives*, International Journal of Pharmaceutics, 2015. **478**(1): 372-382.
62. Xue, H.Y., Liu, S., Wong, H.L., *Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine*, Nanomedicine (Lond), 2014. **9**(2): 295-312.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'utilisation de polymères polycarbonates aliphatiques a été décrite comme une stratégie expérimentale prometteuse pour la formulation de vecteurs de siRNA par différents auteurs [1-4]. Leurs principaux avantages sont leur caractère biocompatible et biodégradable et leur synthèse versatile permettant la formation d'une multitude de polymères fonctionnalisés. De plus, la synthèse des polycarbonates aliphatiques peut être réalisée dans des conditions respectueuses de l'environnement.

Au cours de ce travail, de nombreux polyplexes ont été formulés à base de polymères de type polycarbonates aliphatiques. Lors de la première partie de ce projet, nous sommes parvenus à déterminer les éléments structurels essentiels du polymère, afin d'obtenir des polyplexes efficaces *in vitro*. Les éléments importants que nous avons mis en évidence pour ces polymères sont : (i) une masse moléculaire du polymère de plus de 10 kDa, (ii) la présence d'un rapport des fonctions morpholines/guanidines supérieur à 1 et (iii) la présence d'un groupement hydrophobe capable de conférer un caractère amphiphile au polymère.

Deux stratégies différentes ont ensuite été utilisées pour optimiser l'administration des polyplexes *in vivo*. Du PEG ou de l'acide hyaluronique a été ajouté à la surface des polyplexes dans le but de limiter l'adsorption des protéines plasmatiques et d'augmenter la furtivité vis-à-vis du système immunitaire. Ces modifications de surface sont connues pour augmenter le temps de demi-vie et les chances d'accumulation au niveau de la tumeur. Malgré l'observation d'une accumulation tumorale pour les polyplexes PEGylés, l'efficacité de dégradation de l'ARNm *in vitro* des polyplexes contenant du PEG est diminuée par rapport à celle des polyplexes P-G-M. La même observation a été faite pour les polyplexes contenant de l'acide hyaluronique. Cette diminution d'efficacité mène à la suppression de l'effet antiprolifératif des polyplexes contenant le siRNA HDAC5, et ce, tant pour les polyplexes à base de PEG que ceux à base de HA.

Comme de nombreux chercheurs, nous semblons confrontés au « dilemme du PEG ». Alors que la PEGylation augmente la stabilité des polyplexes et leur accumulation au niveau de la tumeur, elle diminue les interactions avec les membranes provoquant une diminution de la pénétration cellulaire et de la libération de l'endosome. Celle-ci conduit au final à une perte d'efficacité. En effet, le but de la PEGylation est paradoxal puisqu'il s'agit de masquer la charge superficielle positive des polyplexes, avec pour conséquence une réduction de l'interaction des nanoparticules avec les protéines plasmatiques, mais aussi avec les membranes des cellules cibles. Un compromis pourrait théoriquement être trouvé en modulant la densité de couverture et la longueur des chaînes de PEG [5]. Dans notre cas, nous n'avons pas pu mettre en évidence

de différence entre les PEG₇₅₀ et les PEG₂₀₀₀ puisque tous les deux sont confrontés à la même perte d'efficacité.

Au vu de nos résultats, il semble également que ce « dilemme des PEG » soit transposable à d'autres stratégies de masquage de la surface des nanoparticules. Nos résultats montrent en effet que les polyplexes recouverts de 5 % d'acide hyaluronique conservent leur capacité à être internalisés contrairement à ceux recouverts de 12,5 % d'acide hyaluronique probablement en raison d'un masquage trop important de la surface des polyplexes.

Nos résultats mettent également en évidence l'importance d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques et l'efficacité des nanoparticules dans des milieux physiologiques riches en protéines afin de se rapprocher des conditions *in vivo*. En effet, de nombreuses études sont confrontées à des problèmes de corrélation *in vitro/in vivo* pour avoir négligé la complexité des milieux auxquels sont soumis les vecteurs *in vivo*. Comme cela fut constaté dans notre cas, des vecteurs efficaces dans des milieux de culture pauvres en protéines se révèlent souvent inefficaces dans des milieux riches en protéines.

Il semble en tout cas évident que le développement d'un vecteur de siRNA destiné à l'usage humain est une tâche ardue, comportant de nombreuses étapes à franchir avant d'obtenir une efficacité thérapeutique. L'administration de siRNA au moyen de vecteurs non viraux reste un problème complexe et les difficultés sont multiples. Cette technologie se heurte pour l'instant à un problème d'efficacité ; ce qui explique l'absence à ce jour de traitement à base de polyplexes ou de lipoplexes sur le marché. Toutefois, bien que peu d'essais se soient avérés positifs jusqu'à présent, ils représentent un réel espoir pour les traitements futurs. Dans le cadre du ciblage des HDAC en thérapie anticancéreuse, les possibilités que pourrait apporter un nanomédicament de type polyplexe sont grandes : grâce à leur spécificité, les siRNA vectorisés et délivrés permettraient de cibler sélectivement les HDAC pertinentes dans le développement et la croissance tumorale, offrant un nouvel outil thérapeutique de choix dans l'arsenal des traitements contre le cancer.

La recherche d'un vecteur performant et sûr est donc toujours d'actualité et étant donné les propriétés intéressantes des polycarbonates, les perspectives suivantes pourraient être envisagées.

Dans un premier temps, il semble essentiel de comprendre le manque d'efficacité observé avec les P-G-M-PEG et P-G-M + HA. Pour cela, différentes perspectives peuvent être envisagées. Il

serait intéressant de déterminer plus précisément la présence intracellulaire du siRNA, par exemple en éteignant la fluorescence membranaire au moyen du bleu de trypan lors des analyses de cytométrie en flux. Cette technique permettrait de vérifier si les MFI déterminés correspondent réellement au siRNA intracellulaire. L'exploration du devenir intracellulaire des polyplexes et des voies d'entrées qu'ils utilisent pourrait également nous aider à mieux comprendre le manque d'efficacité.

D'autre part, les chaînes de PEG étant directement liées de façon covalente au polymère, nous n'avons pas pu tester l'influence de différentes densités de PEG. Il serait intéressant de tester l'influence de la densité en faisant varier des proportions P-G-M et de P-G-M-PEG. Le pouvoir tampon du polymère P-G-M-PEG₇₅₀ pourrait également être augmenté afin d'observer une éventuelle meilleure efficacité, qui serait la preuve d'une libération plus importante de l'endosome.

Des modifications structurelles pourraient également être envisagées afin d'augmenter l'efficacité du polymère P-G-M. Une perspective intéressante pourrait être l'utilisation d'une liaison labile entre la chaîne de PEG (ou un autre polymère hydrophile) et le reste du polymère. Cette liaison serait sensible à un stimulus spécifique de l'environnement intratumoral, comme une diminution du pH ou la présence d'une enzyme. Après avoir protégé la nanoparticule dans la circulation, le PEG en serait dissocié une fois arrivé au niveau de la tumeur. Après la dissociation, la surface cationique du polyplexe serait exposée aux cellules, permettant une meilleure interaction avec les membranes. Dans notre cas, les cellules seraient ainsi en contact avec les polyplexes P-G-M, qui sont eux capables de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro*.

Nous pourrions également envisager de tester l'effet de la disposition du bloc de PEG dans la structure du polymère. L'équipe de Yang a montré qu'avec le PEG situé entre les deux blocs cationiques du polymère polycarbonate, les polyplexes présentent des groupements cationiques à l'extrémité des chaînes de PEG, favorisant l'entrée cellulaire, même en présence de sérum [6].

Pour l'acide hyaluronique, le rôle de différents facteurs comme la masse moléculaire ou son mode de liaison au polyplexe mériteraient d'être investigués. Certains auteurs ont en effet montré l'importance de ces paramètres dans la formulation de nanoparticules. L'équipe de Wojcicki a par exemple montré une meilleure efficacité lorsque des liposomes sont complexés à de l'acide hyaluronique par une liaison covalente. Qhattal et son équipe ont démontré, quant à

eux, que la masse moléculaire de l'acide hyaluronique utilisé modifie les caractéristiques physico-chimiques et l'entrée cellulaire des liposomes.

Pour améliorer la dégradation du polymère dans l'environnement intracellulaire, des ponts disulfures (-S-S-) pourraient être introduits au niveau de la structure du polymère. Tai et son équipe ont ainsi montré une efficacité accrue de nanoparticules peptidiques contenant des ponts disulfure.

Enfin, des ligands d'adressage pourraient être greffés à la surface des nanoparticules afin d'augmenter l'efficacité d'endocytose et obtenir un ciblage actif.

Par ailleurs, bien que les polycarbonates aliphatiques présentent de nombreuses perspectives, leur synthèse doit encore être optimisée pour améliorer la reproductibilité de leur structure et permettre une synthèse à plus grande échelle. Pour être utilisés un jour en clinique, les polymères devront être répondre à des exigences strictes de qualité permettant de garantir la reproductibilité d'efficacité et de sécurité.

1. Geihe, E.I., Cooley, C.B., Simon, J.R., Kiesewetter, M.K., Edward, J.A., Hickerson, R.P., *et al.*, *Designed guanidinium-rich amphipathic oligocarbonate molecular transporters complex, deliver and release siRNA in cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): 13171-13176.
2. Yang, C., Ong, Z.Y., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Novel biodegradable block copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and cationic polycarbonate: effects of peg configuration on gene delivery*, Macromol Rapid Commun, 2011. **32**(22): 1826-1833.
3. Ong, Z.Y., Fukushima, K., Coady, D.J., Yang, Y.Y., Ee, P.L., Hedrick, J.L., *Rational design of biodegradable cationic polycarbonates for gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 120-126.
4. Dong, X., Tian, H., Chen, L., Chen, J., Chen, X., *Biodegradable mPEG-b-P(MCC-g-OEI) copolymers for efficient gene delivery*, J Control Release, 2011. **152**(1): 135-142.
5. Beck-Broichsitter, M., Nicolas, J., Couvreur, P., *Design attributes of long-circulating polymeric drug delivery vehicles*, Eur J Pharm Biopharm, 2015. **97**(Pt B): 304-317.
6. Yang, S., Coles, D.J., Esposito, A., Mitchell, D.J., Toth, I., Minchin, R.F., *Cellular uptake of self-assembled cationic peptide-DNA complexes: multifunctional role of the enhancer chloroquine*, J Control Release, 2009. **135**(2): 159-165.

RÉSUMÉ

Dans le cadre du traitement de nombreuses pathologies comme le cancer, l'administration de siRNA à des fins thérapeutiques est une approche prometteuse. Administré seul, le siRNA n'est cependant pas capable d'atteindre le cytoplasme des cellules cibles, en raison de sa dégradation rapide par les nucléases et de son incapacité à franchir les membranes cellulaires. Pour le protéger et le conduire jusqu'à son lieu d'action, nous avons développé des vecteurs de siRNA de type polyplexes à base de polymères polycarbonates aliphatiques. L'influence de la structure (linéaire, ramifié), de la masse moléculaire, de la présence de différentes fonctions (guanidine, morpholine) et de l'ajout d'un groupement hydrophobe sur les polymères a été évaluée quant à leur capacité à former des nanoparticules pouvant administrer du siRNA dirigé spécifiquement contre les histones déacétylases (HDAC). Cette famille d'enzymes composée de 18 membres est surexprimée dans de nombreux tissus tumoraux et certaines d'entre elles, telles que l'HDAC5, constituent une cible thérapeutique intéressante dans le traitement antitumoral.

Avec un polymère d'une masse moléculaire supérieure à 10 kDa comprenant une chaîne hydrophobe et une combinaison de fonctions morpholines et guanidines dans un rapport supérieur à 1, les nanoparticules formées ont permis *in vitro*, de diminuer l'expression de l'ARNm ciblé dans les cellules cancéreuses et par conséquent de conduire à l'effet anti-prolifératif induit par l'absence de la protéine HDAC5.

Afin d'optimiser l'efficacité des polyplexes destinés à être administrés par la voie intraveineuse (IV), des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) ont été greffées à la structure de ce polymère. L'ajout de PEG a pour but de limiter l'adsorption des protéines plasmatiques et d'augmenter la furtivité des polyplexes par rapport au système immunitaire. Ces propriétés devraient augmenter le temps de demi-vie des polyplexes dans la circulation et augmenter les chances d'accumulation au niveau tumoral par ciblage passif. En plus de la PEGylation, une alternative a été testée. L'acide hyaluronique a ainsi été utilisé à la place des PEG pour recouvrir la surface cationique des polyplexes. En plus des effets précédemment décrits pour le PEG, l'acide hyaluronique devrait également favoriser le ciblage actif de la tumeur ainsi que l'endocytose grâce à son potentiel rôle de ligand d'adressage par interaction avec son récepteur CD44.

Ces modifications ont été réalisées dans le but d'obtenir une formulation capable d'administrer efficacement du siRNA dirigé contre une histone déacétylase, après une administration par la voie IV.

SUMMARY

The administration of siRNA for therapeutic purposes during the treatment of numerous pathologies such as cancer, is a promising approach. When administered alone, however, siRNA cannot reach the cytoplasm of the target cells due to its degradation by the nucleases and its inability to get past the cell membranes. In order to protect it and deliver it to its zone of action, we have developed aliphatic polycarbonate polymer-based polyplex siRNA vectors. The influence of the structure (linear, ramified), of the molecular mass, the presence of different functions (guanidine, morpholine) and the addition of a hydrophobic group to the polymers was evaluated with regard to their ability to form nanoparticles that can administer siRNA specifically targeted against histone deacetylases (HDAC). This family of enzymes made up of 18 members is over-expressed in many tumour tissues and some of them, such as HDAC5, constitute an interesting therapeutic target in antitumor treatment.

With a polymer having a molecular mass higher than 10 kDa including a hydrophobic chain and a combination of morpholine and guanidine functions in a ratio of more than 1, the nanoparticles formed have enabled, *in vitro*, to decrease the expression of the targeted mRNA in the cancer cells and consequently to lead to the anti-proliferative effect caused by the absence of the HDAC5 protein.

In order to optimise the efficiency of the polyplexes intended to be administered intravenously (IV), polyethylene glycol chains (PEG) were grafted onto the structure of this polymer. The addition of PEG is intended to limit the absorption of plasmatic proteins and increase the stealth of polyplexes with regard to the immune system. These properties should increase the duration of the half-life of the polyplexes in the blood stream and increase the chances of accumulation in the tumour by passive targeting. In addition to PEGylation, an alternative has been tested. Hyaluronic acid was therefore used instead of PEG to cover the cationic surface of the polyplexes. In addition to the effects described for the PEG, the hyaluronic acid should also enable active targeting of the tumour and endocytosis thanks to its potential role as an addressed ligand by interaction with its CD44 receptor.

These modifications were carried out with the objective of obtaining a formulation capable of effectively administering siRNA directed against a histone deacetylase after IV administration.