

La thérapie génique

Plusieurs maladies, dont les maladies neurodégénératives sont souvent réfractaires aux petites molécules thérapeutiques et l'idée de vouloir traiter une maladie en surexprimant ou en inhibant un gène a été élaborée pour la première fois vers la fin des années 1960 (Tolstoshey 1993, Friedmann 1996). Cependant, à ce moment, bien que les chercheurs envisageaient de manière théorique le grand potentiel de la thérapie génique, les avancées technologiques de l'époque ne permettaient pas de transposer la théorie en pratique (Tolstoshey 1993, Friedmann 1996). À partir de 1990, le nombre d'essais cliniques explose, mais ce n'est que dans les années 2000 que l'on a observé les premiers succès cliniques (Ginn et al. 2013).

Il existe principalement deux approches de thérapie génique. La première vise classiquement à restaurer l'expression d'une protéine dont la production ou la fonction est altérée par une mutation dans le gène d'intérêt en introduisant dans l'organisme une copie du gène d'intérêt à l'aide d'ADN (Friedmann 1996). La surexpression protéique peut aussi être utilisée pour augmenter l'expression d'une protéine avec un potentiel thérapeutique (Rosenberg et al. 1990, Friedmann 1996). Alors que la deuxième approche, au contraire, cible l'expression d'un gène pathologique en cherchant à inhiber la traduction du transcrite d'ARNm en protéines en utilisant à titre thérapeutique la voie des ARN interférents (ARNi) (Gonzalez-Alegre 2007).

L'interférence à l'ARN

L'interférence à l'ARN est un phénomène naturel observé chez les eucaryotes (plante, nématode, mammifère, etc.) conduisant à la répression de la traduction ou la dégradation de l'ARNm (Napoli et al. 1990, Van der Krol et al. 1990, Lee et al. 1993, Fire et al. 1998, Bernstein et al. 2003, Rodriguez et al. 2004). La voie de l'interférence à l'ARN joue plusieurs rôles importants dans l'organisme. Cette voie peut être impliquée dans un mécanisme de défense protégeant les cellules de la réplication du génome des virus (Dykxhoorn et al. 2005). De plus, chez les mammifères, cette voie cellulaire est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme, car la voie des ARNi est impliquée dans le contrôle de nombreux processus physiologiques et développementaux. Un dérèglement de la voie

des ARNi serait, par ailleurs, associé avec plusieurs maladies (Ambros 2004, Hammond 2006, Gonzalez-Alegre 2007).

Mécanisme

Les ARN interférents endogènes appelés aussi microARNs (miARN) sont produits dans le noyau par la transcription de séquences d'ADN non codantes (Rodriguez et al. 2004, Du et al. 2005, Zamore et al. 2005). Les gènes codants pour les miARNs sont transcrits sous la forme d'un long fragment d'ARN contenant une séquence en forme d'épingle à cheveux (*hairpin*) nommée miARN primaire (pri-miARN) (Zeng et al. 2004). Par la suite, les pri-miARNs sont reconnus et pris en charge par le complexe protéique formé par DGCR8 et Drosha qui clive les pri-miARNs pour conserver seulement la séquence d'ARN repliée en forme d'épingle à cheveux, appelé précurseur de miARN (pré-miARN) (Le et al. 2003, Du et al. 2005, Han et al. 2006).

Suite au clivage, le pré-miARN est exporté du noyau vers le cytoplasme par la protéine Exportin-5 (Exp5) (Zeng et al. 2004, Zeng et al. 2005). Une fois dans le cytoplasme, le pré-miRNA est clivé par la protéine Dicer pour générer un duplex d'ARN d'environ 22 nucléotides (miARN mature) (Bernstein et al. 2001, Bernstein et al. 2003, Carmell et al. 2004). L'action de Dicer nécessite l'interaction de protéines adaptatrices. Chez les mammifères, Dicer forme un complexe avec la protéine *TAR RNA-binding protein* (TRBP) et Argonaute-2 (Ago-2) (Tahbaz et al. 2004, Chendrimada et al. 2005). La génération d'ARN simple brin par l'action d'Ago-2 initie la formation du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui selon la présence de mésappariement ou non entre le miARN et l'ARNm engendra respectivement la répression de la traduction ou la dégradation de l'ARNm cible (Matranga et al. 2005) (Voir Figure 10).

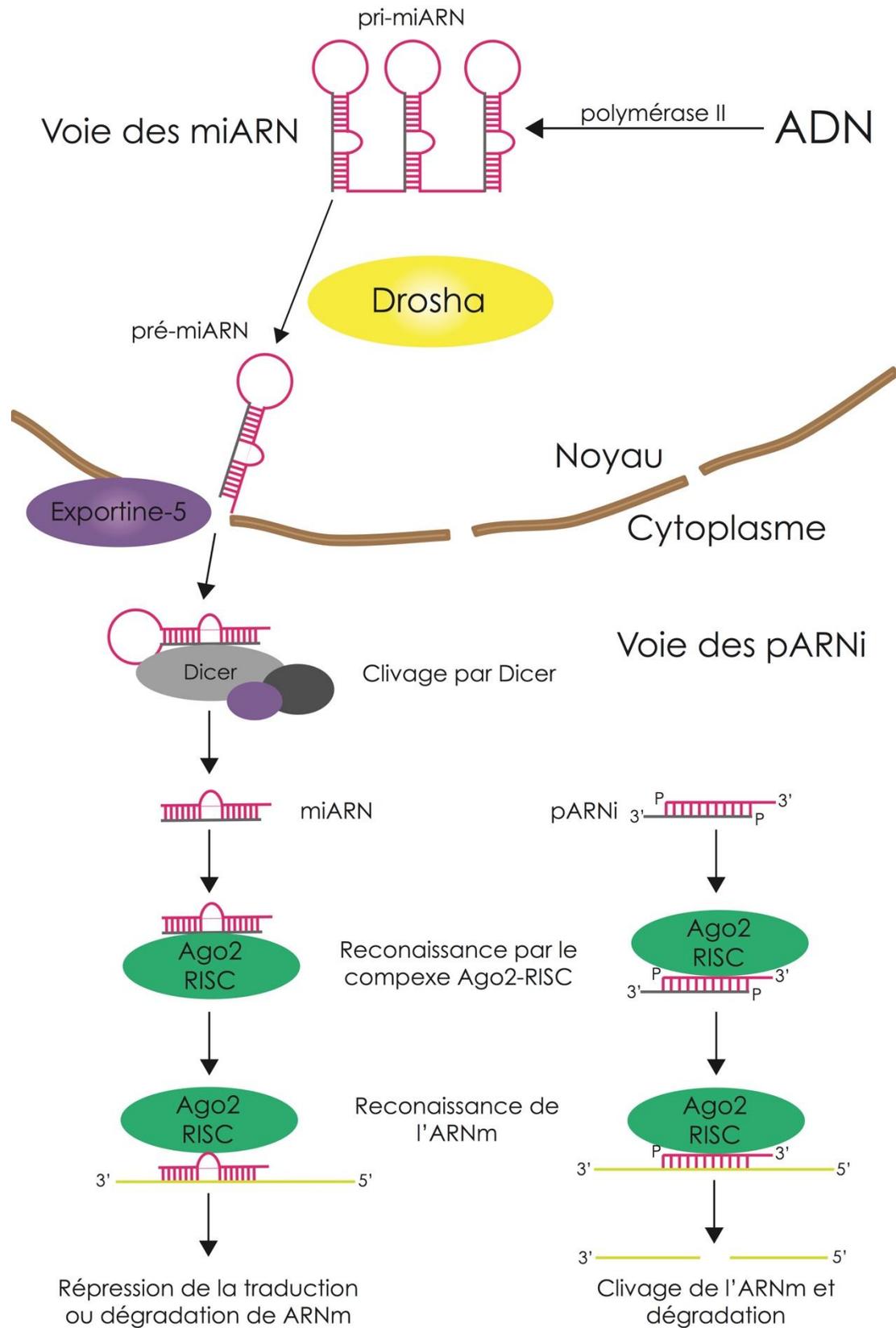


Figure 10: Mécanisme de l'interférence à l'ARN

Utilisation thérapeutique de petits ARN interférents

La découverte du phénomène d'interférence à l'ARN a engendré un grand engouement dans le domaine thérapeutique. Suite à un article publié par Tuschl démontrant les possibilités offertes par la manipulation de la voie des ARNi plusieurs équipes de recherche se penchent sur le développement de médicaments à base d'ARNi dans le but d'inhiber la production de protéines pathologiques (Elbashir et al. 2001, Tuschl 2001).

Molécules thérapeutiques

L'inhibition d'un gène précis peut être effectuée par différents types de molécules formées d'acides nucléiques. Ces molécules aux structures et aux propriétés différentes seront incorporées dans la voie des ARNi à différents niveaux (Amarzguioui et al. 2005). Chacune de ces molécules présente plusieurs avantages et inconvénients et le choix de la molécule peut grandement influencer le succès du traitement (Rodriguez-Lebron et al. 2006, Gonzalez-Alegre 2007).

Petit ARN interférent

Les pARNi sont des duplex d'ARN de 20-25 nucléotides exogènes. Ils sont conçus pour avoir un appariement parfait avec leur ARNm cible et engendrer la dégradation du transcrit d'ARNm (Valencia-Sanchez et al. 2006). Les pARNi sont directement incorporés au niveau du complexe RISC ce qui permet de limiter la saturation de différents éléments cellulaires, en amont de RISC, impliqués dans le clivage et l'export nucléaire (Elbashir et al. 2001). L'effet des pARNi synthétiques est transitoire (Gonzalez-Alegre 2007). De plus, les molécules d'acides nucléiques nues injectées par voie systémique ne traversent aucune membrane cellulaire et déclenchent une réaction inflammatoire importante, en plus d'avoir une demi-vie très courte en circulation (Sah 2006). Le succès de l'utilisation thérapeutique de toutes formes de matériel génétique, autant pour les maladies périphériques que pour les pathologies du SNC, est donc étroitement lié au développement de véhicules de transport pour les acides nucléiques (Oba 2013). Une section de la présente thèse sera d'ailleurs consacrée aux stratégies pour acheminer le matériel génétique aux cellules et à leurs implications dans le transport des médicaments (Sah 2006).

Petit ARN en épingle à cheveux

Les petits ARN en épingle à cheveux (shRNA, pour *short hairpin RNA*) sont généralement le produit d'un vecteur d'expression transfecté dans une cellule hôte (Brummelkamp et al. 2002). Ces ARNi sont générés dans le noyau et doivent être exportés dans le cytoplasme par Exp5 pour entrer dans la voie des ARNi (Gonzalez-Alegre 2007). L'utilisation de vecteurs viraux permet d'avoir une expression stable des shRNA et donc une inhibition génétique durable dans le temps (Gonzalez-Alegre 2007). Cependant, les shRNA produits synthétiquement peuvent engendrer des duplex d'ARN non fonctionnels et une étude a démontré que l'utilisation de ces molécules pouvait être toxique pour l'organisme (Vermeulen et al. 2005, Grimm et al. 2006).

MicroARNs synthétiques

Malgré que leur conception soit relativement complexe, plusieurs groupes de recherche ont développé des molécules thérapeutiques d'acides nucléiques mimant de très près la structure de miARNs endogènes (Stegmeier et al. 2005, Zeng et al. 2005). Les miARNs synthétiques sont généralement générés par la transcription de vecteurs d'expressions viraux (Stegmeier et al. 2005). Les miARNs synthétiques sont pris en charge au tout début de la voie des ARNi. L'utilisation de toutes les étapes de la voie des ARNi mène à une production plus efficace d'ARNi en comparaison avec les shRNAs (Gonzalez-Alegre 2007). Par contre, elle engendre aussi la possibilité de saturer plusieurs composantes de la voie des ARNi et donc de bloquer l'accès aux miARNs endogènes à la machinerie cellulaire (Gonzalez-Alegre 2007).

Transfert de gènes thérapeutiques

Le transfert de gènes thérapeutiques implique l'incorporation de matériel génétique fonctionnel dans le but de remplacer un gène défectueux ou d'induire de manière contrôlée l'expression d'un gène aux propriétés thérapeutiques (Karpati et al. 1996, Barkats et al. 1998, Carter et al. 2001).

Ces gènes aux propriétés thérapeutiques peuvent être acheminés par deux approches distinctes (Karpati et al. 1996, Baekelandt et al. 2000). La première vise à remplacer ou introduire directement

un gène dans un organe ou un type cellulaire précis et est dite directe ou *in vivo* (Svendsen 1993, Ridet et al. 1995, Baekelandt et al. 2000, y Ribotta 2001a). Tandis que la deuxième implique l'injection ou la greffe de cellules modifiées génétiquement, caractérisée d'*ex vivo* ou d'indirecte (Taylor 1997, Baekelandt et al. 2000).

Succès de la thérapie génique

L'idée derrière la thérapie génique est simple et élégante : cibler directement la ou les causes d'une pathologie en réparant ou modifiant l'activité d'un gène défectueux ou pathologique (Karpati et al. 1996). Cependant, la réalité est beaucoup plus complexe. Encore aujourd'hui, il reste toujours beaucoup de chemin à parcourir pour rendre la thérapie génique sécuritaire et efficace afin de pouvoir traduire en clinique les nombreux succès obtenus sur les modèles animaux (Collins et al. 2015, Galli et al. 2015). Malgré plusieurs résultats décevants, certaines études cliniques ont démontré l'énorme potentiel de la thérapie génétique pour guérir un bon nombre de maladies (Collins et al. 2015). Le cœur du problème pourrait être relié au mode de livraison non seulement au niveau cellulaire, mais également au niveau subcellulaire.

Le déficit immunitaire combiné sévère a été la première maladie traitée avec succès à l'aide de la thérapie génique (Kuo et al. 2016). Par contre, malgré la réussite du transfert de matériel génique, cette étude clinique dut être arrêtée abruptement lorsque plusieurs patients commencèrent à développer une leucémie causée par l'injection des vecteurs viraux (Hacein-Bey-Abina et al. 2008, Howe et al. 2008). Ayant démontré la faisabilité et le potentiel de la thérapie chez l'humain, suite à cette étude plusieurs chercheurs se sont dévoués à développer de nouveaux vecteurs viraux plus sécuritaires (Kuo et al. 2016).

Par la suite, dans plusieurs petites études cliniques pilotes, de nombreux patients souffrant de déficit en adénosine désaminase (DAD) ont été traités avec succès par thérapie génique (Bordignon et al. 1993, Onodera et al. 1998, Kuo et al. 2016). Dans ces études, les groupes de patients ont été traités par transfert de matériel génétique *ex vivo* (Bordignon et al. 1993, Onodera et al. 1998). Les cellules souches sanguines des patients ont été prélevées, modifiées génétiquement avec un vecteur viral pour introduire une copie fonctionnelle du gène de la DAD et réintroduites dans l'organisme

(Bordignon et al. 1993, Onodera et al. 1998, Aiuti et al. 2009). Cette stratégie a permis de restaurer de manière suffisante la fonction du système immunitaire chez la majorité des patients (Bordignon et al. 1993, Onodera et al. 1998, Aiuti et al. 2009). Ces études ont démontré qu'en plus d'être efficace, la thérapie génique pouvait aussi être sécuritaire, car aucun patient traité n'a développé de leucémie.

La thérapie génique et les maladies neurodégénératives

À ce jour, il n'existe toujours pas de traitement curatif pour les maladies neurodégénératives. Cependant, les avancées en thérapie génique ouvrent la porte à une multitude de nouvelles cibles thérapeutiques et pourraient possiblement permettre de ralentir, voir stopper la progression de certaines maladies (Collins et al. 2015, Kuo et al. 2016).

Malgré son grand potentiel, la thérapie génique pour le traitement des maladies du SNC n'en est encore qu'à ses premiers balbutiements et pour l'instant, les succès se limitent principalement à son application sur des modèles animaux en phase préclinique (Baekelandt et al. 2000, Gonzalez-Alegre 2007, Nilsson et al. 2010, Douglas 2013, Bartus et al. 2014).

Plusieurs approches de thérapie génique ont été étudiées pour les maladies neurodégénératives, dont la MP et la MA. Suite à des résultats prometteurs obtenus sur des modèles animaux (Baekelandt et al. 2000, Douglas 2013), certaines stratégies ont été testées en études cliniques chez l'humain (Allen et al. 2014). Dans tous les cas, les études cliniques ont conduit à des résultats peu concluants en phase II (Nutt et al. 2003, Marks et al. 2010, LeWitt et al. 2011) ou ont dû être arrêtées suite à l'apparition d'effets secondaires graves reliés par traitement par thérapie génique (Jönhagen et al. 1998, Nauta et al. 1999).

Les nanoparticules

Bons nombres d'études ont suggéré que l'utilisation des AcMs et des peptides pour cibler la BHE était très prometteuse. Cependant, l'utilisation des vecteurs seuls comme médicament pourrait avoir certaines limites. En effet, cette approche nécessite le développement de composés complexes comme les anticorps bispécifiques et les protéines de fusion. De plus, plusieurs composés comme

les pARNi et l'ADN sont difficilement conjugables à un AcM, car ils ne sont pas stables dans la circulation systémique. Cependant, l'utilisation de nanoparticules (NPs) conjuguées à des vecteurs ciblant la BHE pourrait ouvrir la porte à une multitude d'approches thérapeutiques, car il est possible d'y encapsuler une grande variété de composés.

Présentement, de nombreux composés thérapeutiques identifiés par des techniques de criblage à haut débit sont relayés aux oubliettes, car malgré leur grand potentiel thérapeutique, ces molécules possèdent un faible taux de solubilité dans l'eau ou sont dégradées très rapidement par l'organisme, diminuant ainsi leur biodisponibilité systémique. L'utilisation de NPs pourrait permettre l'optimisation et/ou le développement de nouveaux traitements innovateurs. Les NPs permettent (1) d'améliorer la pharmacocinétique et la biodistribution de plusieurs composés (2) d'augmenter l'efficacité d'une molécule en facilitant l'accumulation au site d'action (Leung et al. 2014) (3) de diminuer les effets secondaires en limitant la distribution du médicament dans les tissus sains (Leung et al. 2014) (4) de développer des thérapies combinatoires en encapsulant plusieurs agents thérapeutiques dans une seule NP (Hans et al. 2002, van der Meel et al. 2013). Les NPs sont aussi des outils très malléables, il est donc possible de faire plusieurs types de modifications différentes à leur surface afin d'augmenter leur spécificité et/ou leur stabilité en circulation (Hans et al. 2002, van der Meel et al. 2013).

Les NPs présentement utilisées à des fins thérapeutiques ou diagnostiques sont principalement composées de lipides (liposomes, nanoémulsions, nanoparticules lipidiques solides (NPLS)), de polymères (NPs polymères, micelles polymères, nanogels, dendrimères) ou de composés organométalliques (NPs d'oxyde de fer, points quantiques) (Cupaioli et al. 2014).

Nanoparticules lipidiques

La découverte de la formation des nanoparticules lipidiques (NPLs) remonte à la publication des travaux de Bangham et collaborateurs durant les années 1960 qui ont observé la formation spontanée de vésicules concentriques suite à la dispersion de lécithine dans l'eau (Bangham et al. 1964). Suite à cette découverte, de nombreuses études portant sur les propriétés de ces vésicules lipidiques ont mis en évidence leur capacité à retenir ou encapsuler différents solutés au même titre que les membranes cellulaires (Sessa et al. 1968, Gregoriadis 1973). Ces études portant sur les

vésicules lipidiques maintenant appelées liposomes ont permis l'application des NPLs pour le transport de diverses molécules (Gregoriadis et al. 1971a, Gregoriadis et al. 1971b, Mayer et al. 1986).

Liposomes

Les liposomes sont des vésicules dont la taille peut varier entre 50 et 500 nm formés de lipides biocompatibles et biodégradables (principalement des phospholipides et de cholestérol) semblables aux lipides retrouvés dans les membranes biologiques. Les liposomes sont formés par un phénomène d'autoassemblage sous forme d'une bicouche de phospholipides créant ainsi une NP avec un centre aqueux (Mallick et al. 2014). Ces nanoparticules sont très versatiles et une grande quantité de molécules, autant hydrophiles que lipophiles peuvent y être encapsulées (Kaur et al. 2004, Pensado et al. 2014). Les molécules hydrosolubles sont retenues au sein du cœur aqueux des liposomes tandis que les composés plus lipophiles ou amphiphiles s'incorporent dans la bicouche de phospholipides (Sofou et al. 2008).

L'intérêt de l'utilisation des liposomes pour le transport des molécules thérapeutiques est principalement dû à leur habileté à augmenter l'efficacité des médicaments tout en réduisant les effets secondaires indésirables (Leung et al. 2014). Certaines formulations de liposomes sont, en effet, développées pour relâcher de manière plus ciblée leur contenu, limitant ainsi la distribution du médicament dans tout l'organisme (Hans et al. 2002). Plusieurs études ont démontré que la vascularisation de certaines tumeurs et sites d'infections était plus perméable que dans des tissus sains. Cette perméabilité accrue favoriserait ainsi l'accumulation des liposomes dans les tissus malades permettant un relâchement des médicaments à leur site d'action (Skinner et al. 1990, Steinberg et al. 1990, Yuan et al. 1994, Yuan et al. 1995, Kozłowska et al. 2009). De plus, causé par un mauvais drainage lymphatique des tumeurs, un phénomène de rétention accru favorise l'accumulation des liposomes dans l'espace interstitiel des tumeurs (Maeda et al. 2000, Maeda 2001).

Les liposomes sont probablement les nanovéhicules les plus couramment utilisés pour le transport d'acides nucléiques (Felgner et al. 1987, Leung et al. 2014, Mallick et al. 2014, Xue et al. 2014). Cependant, les NPs administrées par voie systémique, principalement due à l'utilisation de lipides

cationiques peuvent engendrer des interactions non spécifiques avec les protéines du plasma comme l'albumine et les protéines du complément (Simões et al. 2005, Bertrand et al. 2012). L'ajout de lipides cationiques favorise la complexation du matériel génétique avec la NP, mais peut aussi créer un excès de charges à la surface de la NP (Simões et al. 2005). De plus, de nombreuses études ont aussi démontré que les NPs cationiques pouvaient engendrer des effets toxiques sur les modèles d'animaux comme une augmentation considérable du taux de mortalité (Tousignant et al. 2000, Tan et al. 2002, Xue et al. 2014).

La présence de PEG dans les formulations de liposomes joue un rôle crucial dans la stabilité systémique des NPs. En effet, les liposomes dits conventionnels sont rapidement éliminés par le système réticuloendothélial (SRE) suite à une injection systémique (Aragno et al. 1986, Messerschmidt et al. 2010). Cependant, leur temps de circulation peut grandement être augmenté par l'ajout de lipides fonctionnalisés et/ou de polyéthylène glycol (PEG) (Maruyama et al. 1997, Maruyama 2002, Kozłowska et al. 2009). L'ajout de ces molécules permet de diminuer les interactions entre les protéines du sérum et les liposomes et donc de réduire la toxicité, l'opsonisation ainsi que la prise en charge par le SRE (Maurer et al. 2001a, Maurer et al. 2001b, Dos Santos et al. 2007).

Immunoliposomes

Bien que les liposomes soient capables de s'accumuler de manière préférentielle dans certains tissus, certains organes comme le cerveau ou type de tumeurs sont plus difficiles à pénétrer (Hans & Lowman 2002). De plus, l'ajout d'un ligand spécifique à un récepteur permet une interaction directe avec une population de cellules précise et permet d'augmenter la rétention de la NP à un endroit ciblé (Huang et al. 1983, Forssen et al. 1998, Kozłowska et al. 2009). Lorsque des AcMs ou des fragments d'AcMs sont utilisés, le complexe formé du liposome et de son vecteur se nomme immunoliposome (Cheng et al. 2010).

Les premières études sur les immunoliposomes ont mené au développement de trois différentes structures de NPs ciblées (Maruyama 2002) (Figure 11) :

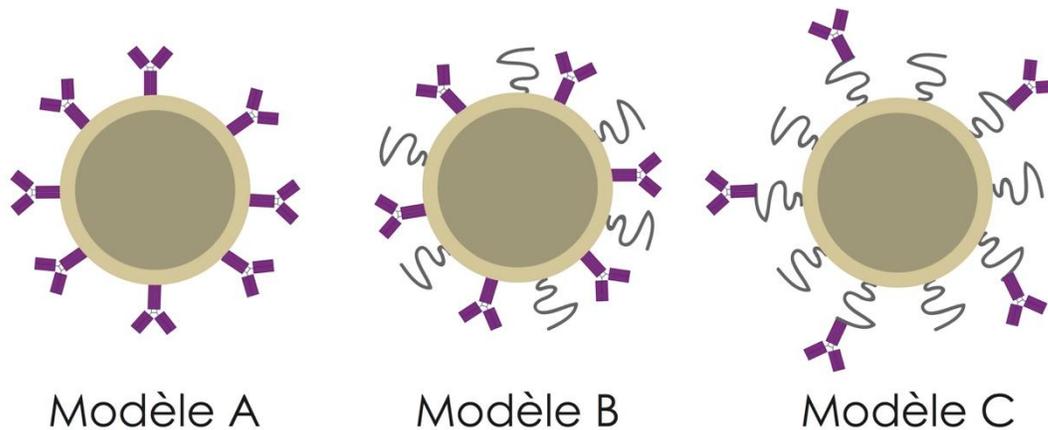


Figure 11: Représentation schématique des différentes structures d'immunoliposomes.

Sarah Paris-Robidas®

1. Modèle A : Les anticorps sont directement fixés sur les lipides à la surface du liposome. Ce modèle démontre une bonne capacité d'internalisation *in vitro*, cependant son efficacité est grandement réduite *in vivo* (Huang et al. 1980, Peeters et al. 1988, Wright et al. 1989). Ce type de liposome ne contient aucun PEG et est éliminé rapidement par le SRE (Aragnol et al. 1986).
2. Modèle B : Formulation de liposomes à laquelle du PEG a été ajouté et où les vecteurs sont directement conjugués à membrane lipidique de la NP. Cette formulation d'immunoliposomes contenant du PEG permet de réduire l'accumulation de la NP dans le SRE (Torchilin et al. 1992). Cependant, les nombreuses molécules de PEG créent une barrière stérique limitant les interactions entre le vecteur et son récepteur, affectant ainsi la capacité d'internalisation de la NP (Maruyama 2002).
3. Modèle C : Liposomes PEGuylés auxquels les vecteurs sont rattachés aux chaînes de PEG (Allen et al. 1995). Ce type d'immunoliposomes permet une augmentation du temps de circulation systémique ainsi qu'une bonne accessibilité du vecteur pour sa cible (Maruyama et al. 1997, Maruyama 2002, Kozłowska et al. 2009).

Par ailleurs, dans le laboratoire une formulation d'immunoliposomes a été développée en se basant sur la composition de la formulation utilisée dans le laboratoire du Dr Partridge et une méthode

d'encapsulation de l'ADN induite par l'éthanol (Bailey et al. 2000, Shi et al. 2000, Rivest et al. 2007). Cette formulation optimisée pour l'utilisation *in vivo* est composée d'un mélange de phospholipides (93% POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine ; 3% DDAB, dimethyldioctadecylammonium ; 3% DSPE-PEG₂₀₀₀, distearoylphosphatidylethanolamine et 1% DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide) et permet d'obtenir des immunoliposomes d'une taille <100 nm, possédant une charge résiduelle neutre et des taux d'encapsulation d'ADN de 70% et ce de manière hautement reproductible (Rivest et al. 2007). De plus, la conjugaison d'un anticorps ciblant le RTf (Ri7 ou 8D3) a permis d'augmenter les taux de transfection dans un modèle de cellules neuronales en culture d'environ 20 fois en comparaison avec les liposomes non conjugués (Rivest et al. 2007).

Nanoparticules polymères

Les NPs polymères (NPPs), comme leur nom l'indique, sont des NPs solides formées de polymères naturels (protéines ou polysaccharides) ou synthétiques. Les matériaux utilisés pour la fabrication des NPPs doivent être biodégradables, biocompatibles et non-toxiques afin de pouvoir être utilisés chez l'animal et chez l'homme (Torchilin 2001, Popovic et al. 2006). Les polymères synthétiques offrent de nombreux avantages sur les polymères naturels, car la synthèse des polymères synthétiques est plus reproductible et ceux-ci sont aussi beaucoup plus facilement modifiables (Hans et al. 2002, Cupaioli et al. 2014).

Les polymères les plus fréquemment utilisés pour la fabrication de NPs sont l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA) et leur copolymère l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA). Par ailleurs, des médicaments en formulation avec deux de ces polymères, le PLA et le PLGA, sont approuvés par la FDA aux États-Unis (Costantino 2010, Costantino et al. 2012). Ces polymères sont biocompatibles et sont naturellement hydrolysés en monomères d'acide lactique et d'acide glycolique. Un autre polymère grandement utilisé dans les formulations de NPs est le poly(cyanoacrylate d'alkyle), développé spécifiquement pour le ciblage thérapeutique au cerveau (Vauthier et al. 2007, Andrieux et al. 2009). Aucune formulation thérapeutique contenant ce polymère n'a été approuvée par la FDA pour le moment, mais le poly(cyanoacrylate d'alkyle) est présentement utilisé en étude clinique de phase II (Cupaioli et al. 2014).

Comme pour les NPLs, il est aussi possible de modifier les NPPs en surface ou d'ajouter un ligand spécifique permettant un ciblage plus précis au niveau d'un organe (Hans et al. 2002, Aktaş et al. 2005). Des études ont en effet démontré que l'ajout d'un ligand à la surface de la NPs permettait d'augmenter l'efficacité de transfection *in vitro* (Haubner et al. 1996) ainsi que d'augmenter la spécificité des NPs (Vachutinsky et al. 2011, Oba 2013).

Micelles

L'utilisation des liposomes a apporté plusieurs résultats prometteurs avec plusieurs molécules peu hydrophiles. Cependant, le cœur aqueux de la NP peut rendre problématique l'encapsulation de molécules insolubles dans l'eau (Torchilin 2007). Une alternative envisageable est l'utilisation de micelles formées par des composés amphiphiles (Torchilin 2007). Les micelles polymères sont des structures colloïdales, dont la taille varie entre 5 et 100 nm formées par l'autoassemblage de polymères amphiphiles possédant un groupement hydrophile en surface avec une queue hydrophobe (Cupaioli et al. 2014). Ce type de NPs est composé d'un cœur hydrophobe stabilisé par une coquille hydrophile en surface, permettant une bonne stabilité systémique (Adams et al. 2003, Torchilin 2007). Le centre hydrophobe de la NP permet l'encapsulation de composés peu solubles dans l'eau (Cupaioli et al. 2014).

L'utilisation des micelles à titre de nanovéhicule offre de nombreux avantages pour plusieurs médicaments (Jones et al. 1999, Torchilin 2001). Tout d'abord, les micelles vont permettre d'améliorer la biodistribution des composés peu solubles ainsi que le temps de circulation systémique de nombreuses molécules (Torchilin 2007). De plus, grâce à leur petite taille, les micelles vont préférentiellement s'accumuler dans l'interstice des tissus possédant une vascularisation plus perméable associée à plusieurs tumeurs et sites d'infection ou d'infarctus (Maeda 2001, Torchilin 2007) . À titre d'exemple, il a été démontré que plusieurs agents anticancéreux s'accumulaient davantage au sein des tumeurs suite à leur encapsulation dans une micelle (Kwon et al. 1995, Adams et al. 2003). De plus, cette accumulation accrue au sein des tissus malades va permettre de diminuer la toxicité cellulaire et certains effets secondaires engendrés par plusieurs composés.

La spécificité de ciblage des micelles peut aussi être améliorée par l'ajout de ligands à leur surface (Felber et al. 2011, Oba 2013). Plusieurs études utilisant des AcMs, la Tf ou des résidus d'acide folique ont démontré une augmentation significative de l'accumulation des micelles ciblant un système de transport en comparaison avec les NPs non conjuguées (Chekhonin et al. 1991, Vinogradov et al. 1999, Torchilin 2001, Torchilin 2004). Plus précisément, l'ajout de ligands comme l'acide folique ou d'AcM ciblant le RTf a permis de favoriser le transport d'ADN plasmique et d'agents anticancéreux dans différents modèles *in vitro* (Felber et al. 2011, Zhang et al. 2016). De plus, il a été démontré que la conjugaison de l'AcM 2C5, capable de cibler une grande variété de tumeurs, améliorait l'efficacité du paclitaxel *in vitro* dans un modèle de cellule du cancer du sein (MCF-7) (Gupta et al. 2007). De plus, une accumulation accrue au niveau des tissus tumoraux dans un modèle expérimental de carcinome pulmonaire a été observée avec ce même complexe micellaire (Gupta et al. 2007). Malgré plusieurs résultats encourageants, certaines études suggèrent que les micelles retiennent difficilement leur chargement en principe actif (Adams et al. 2003). Des travaux portant sur l'amélioration de la formulation seront nécessaires afin d'adresser cette problématique.

L'utilisation en clinique des nanoparticules

Le Doxil® a été le premier nanomédicament à faire son apparition en clinique en 1995 (Barenholz 2012). En date de 2013, selon une étude d'Etheridge et collaborateurs, environ 250 formulations de nanomédicaments étaient soit en étude clinique ou commercialisées (Tableau 10) (Etheridge et al. 2013). Les différentes nanoformulations en développement sont axées principalement pour le traitement du cancer, mais cette étude démontre tout de même que les nanoparticules peuvent avoir des applications variées notamment pour le traitement des maladies infectieuses, cardio-vasculaires, inflammatoires et dégénératives (Etheridge et al. 2013) (Voir Figure 12).

Tableau 10 : Survol des différentes nanoformulations commerciales ou à l'étude

Formulations	Expérimental			Commercial		
	Thérapeutique	Dispositif médical	Total	Thérapeutique	Dispositif médical	Total
NP solides	3	12	15	0	28	28
Nanodispersions	5	0	5	1	1	2
NP polymères	23	0	23	9	0	9
NP protéiques	4	0	4	2	0	2
Liposomes	53	0	53	7	1	8
Émulsions	18	1	19	9	0	9
Micelles	8	0	8	3	1	4
Dendrimères	2	2	4	0	3	3
Virosomes	6	0	6	2	0	2
Nanocomposites	0	0	0	0	18	18
Enrobage NP	0	2	2	0	6	6
Matériaux nanoporeux	0	3	3	0	2	2
NPs à motifs	0	2	2	0	2	2
Points quantiques	0	1	1	0	4	4
Fullerènes	0	1	1	0	0	0
Hydrogels	0	0	0	0	1	1
Nanotubes de carbone	0	1	1	0	0	0
Total	122	25	147	33	67	100

Abréviations : Nanoparticule, NP. Tiré de Etheridge et al. 2013

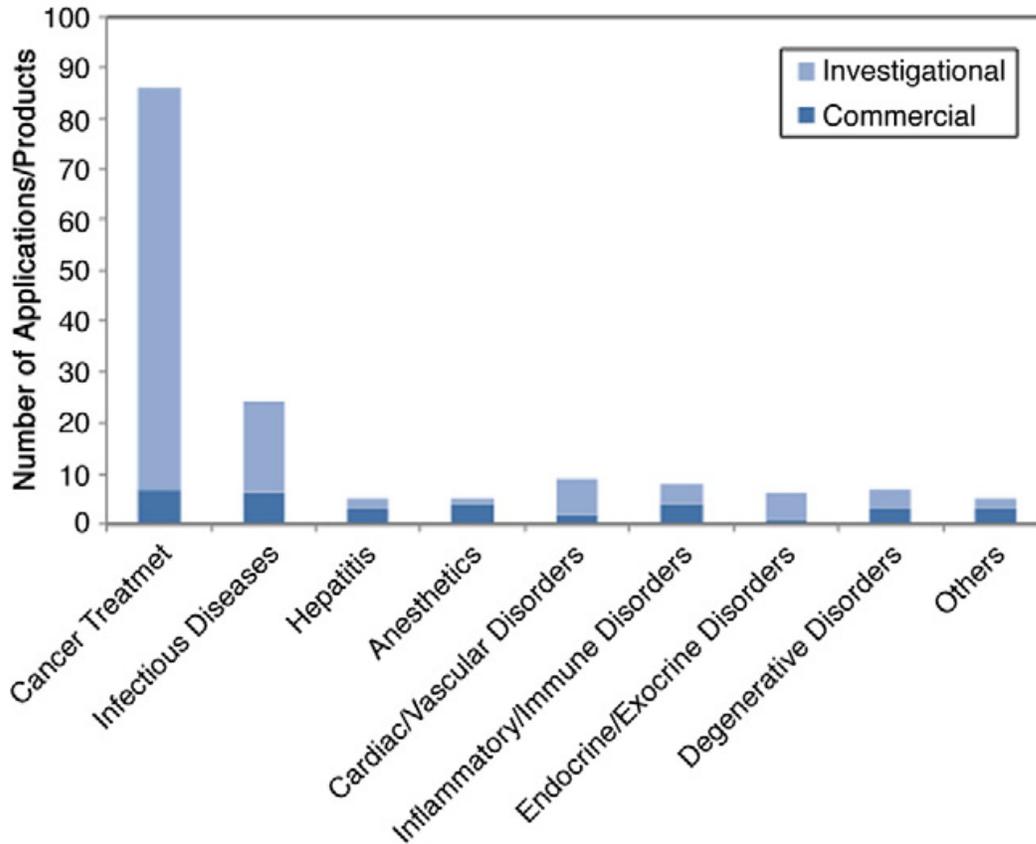


Figure 12: Utilisation médicale pour les différentes nanoformulations. Tiré de Etheridge et al. 2013

Présentement, la totalité des NPs approuvée pour leur utilisation en clinique sont dépourvues de ligands permettant un ciblage spécifique et seul un faible pourcentage de NPs ciblées sont en présentement aux premiers d'essais cliniques (van der Meel et al. 2013). En date de 2013, dans une revue de la littérature publiée par van der Meel et collaborateurs, les auteurs rapportaient 13 formulations de nanoparticules ciblant différents récepteurs et protéines (RTf, HER2, EGFR, etc.) développées pour le traitement du cancer (van der Meel et al. 2013) (voir tableau 11).

Tableau 11 : Résumé des différentes nanoformulations conjuguées à un ligand en études cliniques

Nom du produit	Compagnie	Taille (nm)	Agent thérapeutique	Ligand	Cible	Indication	Stade clinique
Nanoparticules lipidiques							
MBP-426	Mebiopharm	50-200	Oxaliplatine	Protéine	RTf	Cancer de l'estomac et de l'œsophage	Phase II
SGT-53	SynerGene Therapeutics	90	ADN plasmique p53	scFv	RTf	Tumeurs solides	Phase Ib
SGT-94	SynerGene Therapeutics	90	ADN plasmique RB94	scFv	RTf	Tumeurs solides	Phase I
MM-302	Merrimack Pharmaceuticals	75-110	Doxorubicine	scFv	HER2	Cancer du sein	Phase I
Lipovaxin-MM	Lipotek		Antigènes contre le mélanome et	dAb	DC-SIGN	Vaccin contre le mélanome	Phase I
Anti-EGFR IIs-DOX	Hôpital Universitaire de Basel	85	Doxorubicine	Fab'	EGFR	Tumeurs solides	Phase I
2B3-101	to-BBB Technologies		Doxorubicine	Protéine	Transporteur du glutathione	Cancer et métastases au cerveau	Phase I/IIa
MCC-465	Mitsubishi Pharma Corporation	140	Doxorubicine	F(ab')2	Inconnue	Cancer de l'estomac avancé	Phase I discontinuée
Nanoparticules polymères							
BIND-014	BIND Biosciences	100	Docétaxel	Petite molécule	Antigènes de membrane de la prostate	Tumeurs solides	Phase II
CALAA-01	Calando Pharmaceuticals	50-70	pARNi RRM2	Protéine	RTf	Tumeurs solides	Phase I
SEL-068	Selecta Biosciences	150-250	Antigènes nicotiques, agoniste TLR	Petite molécule	Cellules présentatrices d'antigènes	Vaccin pour l'arrêt du tabagisme	Phase I
Dérivée des bactéries							
Erbixux® EDVspac	EnGeneIC	400	Paclitaxel	Anticorps	EGFR	Tumeurs solides	Phase II
Vecteur rétroviral							
Rexin-G	Epeius Biotechnologies	100	Construit d'ADN cyclin-G1	Petite molécule	Collagène	Sarcome, cancer des os et du pancréas	Phase II

Abréviations : *epidermal growth factor receptor*, EGFR; Récepteur de la transferrine, RTF; *Single-chain variable fragment*, scFv; *Toll-like receptor*, TLR. Adapté de van der Meel et al. 2013.

L'avantage des nanoparticules pour la thérapie génique

Jusqu'à présent, les virus ont préférentiellement été utilisés pour la thérapie génique à cause à leur haut tût de transfection. Cependant, certains effets secondaires graves reliés à leur utilisation limitent grandement leur application en clinique. Les NPs offrent une alternative plus sécuritaire que l'utilisation des virus pour la thérapie génique, car elles engendrent moins de réactions immunitaires et limitent les risques de recombinaison avec le génome (Ditto et al. 2009). Au cours des dernières années, beaucoup d'efforts ont été investis dans le développement de formulations de NPs plus performantes (Ditto et al. 2009). Les recherches sur le développement de formulations de NPs pour la thérapie génique ont progressées et plusieurs formulations de NPs lipidiques sont à l'étude en clinique. Les compagnies Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, Massachusetts) (Coelho et al. 2013) et Tekmira Pharmaceuticals (Burnaby, Colombie-Britannique) (Geisbert et al. 2010) ont des formulations dans différents stades d'études cliniques utilisant la technologie des pARNi (Leung et al. 2014). Alnylam Pharmaceuticals possède une formulation très prometteuse (ALN-TTR02) présentement en étude clinique de phase III pour traiter une forme d'amyloïdose (*transthyretin amyloidosis*) (Leung et al. 2014). L'étude préalable chez l'humain avait démontré une réduction soutenue des niveaux de transthyretin allant jusqu'à 28 jours après l'injection d'une seule dose contenant 0.3 mg/kg de pARNi (Coelho et al. 2013).

L'utilisation des nanoparticules pour le ciblage thérapeutique au cerveau

La BHE limite grandement l'entrée des médicaments au cerveau et selon plusieurs études l'utilisation de NPs conjuguées à différents vecteurs ciblant les CECCs permettrait d'augmenter la biodistribution de nombreux agents thérapeutiques au cerveau (Gupta et al. 2007, Boado et al. 2011b, Ulbrich et al. 2011, Loureiro et al. 2014, Lindqvist et al. 2016). Les nanoparticules possèdent un avantage de taille pour le ciblage thérapeutique. Contrairement aux virus, la surface des nanoparticules peut être modifiée facilement et il est possible d'y ajouter un anticorps ou un peptide ciblant un organe comme le cerveau (Maruyama 2002, Olivier 2005, Ulbrich et al. 2011, Clark et al. 2015).

De premières études menées par Kreuter et collaborateurs ont mis en évidence l'accumulation de NPs au cerveau (Kreuter 2001). Dans ces études, les auteurs ont observé une accumulation spécifique des NPs formées de polymères de polybutylcyanoacrylate recouvertes d'un surfactant, le

polysorbate (PS)-80 en comparaison avec les NPs non recouvertes (Alyautdin et al. 1995, Kreuter et al. 1995). Des analyses plus poussées ont permis de démontrer que les NPs recouvertes de PS-80 traversaient la BHE suite à leur liaison avec le récepteur LRP-1 via l'absorption de l'alipoprotéine E (Kreuter et al. 2002). Par la suite, des études avec des immunoliposomes ciblant le RTf et le récepteur de l'insuline ont été effectuées chez les rongeurs et le primate, respectivement, et ont mené à des résultats prometteurs (Shi et al. 2000, Shi et al. 2001a, Shi et al. 2001b, Zhang et al. 2003a, Boado 2007). En effet, l'injection d'immunoliposomes ciblant la BHE contenant des gènes rapporteurs codants pour lacZ ou la luciférase a été associée à une plus forte expression des gènes d'intérêts au cerveau spécifiquement chez les animaux injectés avec les immunoliposomes conjugués avec un vecteur ciblant la BHE (Shi et al. 2000, Shi et al. 2001a, Shi et al. 2001b, Zhang et al. 2003a, Boado 2007).

De plus, des études utilisant des plasmides codants pour des gènes thérapeutiques ont permis de mettre en évidence le potentiel des immunoliposomes dans le traitement des pathologies du SNC (Boado et al. 2011b). En effet, des études effectuées sur un modèle de la MP, le rat 6-OHDA, ainsi que sur un modèle murin de mucopolysaccharidose ont permis d'observer des effets bénéfiques se traduisant par la présence des enzymes TH et β -glucuronidase dans les modèles de la MP et de la pathologie lysosomale respectivement (Zhang et al. 2003b, Zhang et al. 2008).

Ciblage thérapeutique du RTf via l'utilisation de nanoparticules

Le potentiel du RTf pour le transport des médicaments au cerveau a été soulevé à plusieurs reprises (Huwylar et al. 1996, Shi et al. 2001b, Qian et al. 2002, Hatakeyama et al. 2004, Schnyder et al. 2005, Ko et al. 2009, van Rooy et al. 2011, Sharma et al. 2013, Sharma et al. 2014, De Luca et al. 2015, Johnsen et al. 2016). Une étude par van Rooy et collaborateurs aurait même démontré une accumulation supérieure au cerveau de liposomes ciblant le RTf à l'aide d'un AcM (Ri7.217) en comparaison d'autres systèmes de transports présents à la BHE (LRP, IGFR, LDLR) (van Rooy et al. 2011). Selon une revue de la littérature par Johnsen et Moos, la composition de la formulation liposomale ne semblerait pas affecter l'accumulation cérébrale, car de nombreuses études utilisant des formulations de NPs différentes semblent observer des pourcentages d'accumulation cérébrale similaire (Johnsen et al. 2016). De plus, l'encapsulation d'oligonucléotides dans les immunoliposomes a permis de mettre en évidence l'efficacité fonctionnelle du système de transport

au cerveau via le RTf (Shi et al. 2000, Shi et al. 2001b, Zhang et al. 2003b, Zhang et al. 2004). Dans ces études, le groupe du Dr Pardridge a observé l'expression de gènes exogènes comme la β -galactosidase ou la TH. Cependant, comme pour l'utilisation d'AcM ciblant le RTf, il existe une controverse quant à la transcytose des NPs décorées avec ces mêmes AcM (Lichota et al. 2010). Bien que certaines publications aient démontré une efficacité thérapeutique suite à l'administration d'immunoliposomes dans modèles animaux (Zhang et al. 2003b, Zhang et al. 2004), d'autres études ont aussi démontré une accumulation des NPs au sein des CECCs (Gosk et al. 2004, Lichota et al. 2010). De plus, peu d'études se sont intéressées à clairement comprendre les mécanismes de transport des NPs par les CECCs (Visser et al. 2005, Sharma et al. 2014, Zong et al. 2014). Cependant, il sera essentiel dans le futur d'investiguer et de comprendre les mécanismes d'internalisations des NPs afin de pouvoir développer des systèmes de transport efficaces à travers la BHE (Johnsen et al. 2016).

Hypothèse

La BHE forme une barrière physiologique protégeant le cerveau contre nombreuses molécules neurotoxiques. D'un point de vue pharmacologique, la BHE représente un défi de taille, car elle restreint l'accès au cerveau de la quasi-totalité des médicaments destinés au traitement des maladies du SNC. Cependant, comme le cerveau est aussi un organe nécessitant un apport important en nutriments, une grande quantité de transporteurs spécifiques sont présents au sein des CECCs. Il serait possible de cibler un transporteur spécialisé présent sur les CECCs à l'aide d'un ligand (peptides, protéines, AcM). Au cours des 20 dernières années, plusieurs articles ont rapporté des effets thérapeutiques potentiels suite à l'utilisation de molécules ciblant des transporteurs présents à la BHE chez des modèles animaux (Zhang et al. 2006, Zhang et al. 2009c, Boado et al. 2010d). Cependant, bons nombres des résultats prometteurs obtenus par le passé proviennent d'évidences indirectes et sont peu reproductibles. De plus, beaucoup d'études sur le ciblage thérapeutique au cerveau sont menées par des compagnies pharmaceutiques travaillant avec molécules brevetées qui ont des intérêts financiers à présenter des résultats favorables. En conséquence, l'objectivité de plusieurs publications pourrait être remise en question et peu d'études indépendantes permettant de confirmer les résultats sont publiés. Les quelques-unes qui existent tendent plutôt à remettre en question la transcytose de la Tf ou des AcMs qui s'y lient. Ces lacunes et les questions qui restent en suspens nuisent grandement au développement d'approches réellement efficaces et après 30 ans de recherche dans le domaine, seuls trois composés ont fait l'objet d'études cliniques de phase I et un seul a franchi la phase II. Nous émettons donc l'hypothèse que le développement d'une approche systématique pour caractériser le transport d'AcM ciblant le RTf en combinant des méthodes quantitatives et qualitatives pour visualiser les AcMs permettra une caractérisation *in vivo* plus rigoureuse dans l'optique d'obtenir des résultats concluants en études cliniques. Ultiment, la stratégie que nous proposons permettrait de développer des stratégies thérapeutiques adaptées en fonction des types cellulaires ciblés pour le traitement des maladies du SNC.

Objectifs

Objectif général

Avec l'augmentation croissante de la population vieillissante, le fléau des maladies neurodégénératives augmente sans cesse. Pendant longtemps, les compagnies ont ignoré le problème engendré par la présence de la BHE et encore aujourd'hui, il n'existe aucun traitement capable de stopper la progression de ces pathologies. Il est donc impératif de concevoir de nouvelles approches afin de permettre le développement des traitements curatifs pour les maladies neurodégénératives. L'objectif général de cette thèse vise donc à développer et à caractériser une approche systématique combinant la pharmacocinétique et la microscopie en utilisant l'AcM Ri7 ciblant le RTf afin d'évaluer le potentiel de la thérapie génique dans le traitement des maladies neurodégénératives via l'utilisation de nanoparticules.

Objectifs spécifiques

Dans le but de développer une approche de ciblage thérapeutique, il est essentiel de caractériser la distribution cérébrale du vecteur utilisé. Nous avons donc procédé à l'injection chez la souris de l'AcM ciblant le RTf Ri7 marqué avec des molécules fluorescentes de types Alexa Fluor™ (AF) et effectué la caractérisation de l'accumulation cérébrale. Dans cette étude, nous avons tout d'abord mesuré l'accumulation du Ri7 au cerveau puis utilisé la microscopie à épifluorescence et confocale pour étudier la distribution cérébrale ainsi que l'internalisation de Ri7 au niveau des CECCs. Ces résultats font l'objet du Chapitre II.

Le deuxième objectif de ce projet était de déterminer si l'AcM était internalisé par les CECCs suite à une injection systémique et si les CECCs étaient capables d'internaliser un cargo rattaché à l'anticorps. Pour ce faire, nous avons conjugué l'AcM Ri7 et un AcM contrôle isotypique (2a3) à des points quantiques. Tout d'abord, nous avons commencé par vérifier la spécificité de l'internalisation du complexe via le RTf sur des lignées de cellules neuronales (N2A) et d'endothélium cérébral

(bEnd5). Nous avons procédé à une injection systémique du complexe chez la souris et comparé la biodistribution du complexe conjugué au Ri7 avec le contrôle 2a3. Par la suite, par des approches de microscopie en fluorescence et de microscopie électronique, nous avons étudié la distribution cérébrale ainsi que la distribution subcellulaire des complexes formés par la conjugaison des points quantiques avec le Ri7. Ces résultats font l'objet du Chapitre III.

Par la suite, pour le troisième objectif de ce projet de recherche, nous nous sommes intéressés au transport d'acides nucléiques via une nouvelle formulation de complexes micellaires polyioniques (CMP) développée par l'équipe du Dr Jean Christophe Leroux. Dans cette étude, nous avons procédé à la caractérisation de l'accumulation cellulaire du CMP conjugué à un fragment Fab' de l'AcM Ri7 sur des cellules N2A. Suite à l'encapsulation de siGLO Red, un petit duplex d'ARN double brin, des analyses en microscopie à fluorescence ont permis d'analyser la spécificité de l'accumulation du complexe via le RTf ainsi qu'une cinétique d'internalisation par des colocalisations avec les marqueurs EEA-1 (*early endosome antigen-1*), RTf et LAMP-1. De plus, nous avons aussi étudié la distribution cérébrale des CMPs suite à une injection systémique chez la souris Tie2GFP. Ces résultats font l'objet du Chapitre IV.

Les liposomes sont probablement encore maintenant les NPs les plus utilisées pour le ciblage thérapeutique. Pour le dernier objectif de ce projet, nous avons étudié l'accumulation ainsi que la distribution cellulaire d'une formulation liposomale conjuguée à l'AcM Ri7. Suite à l'encapsulation du siGLO Red, cette formulation a fait l'objet de diverses analyses *in vitro* visant à caractériser l'accumulation cellulaire. De plus, nous avons aussi procédé à une étude de la distribution cérébrale de la NP ciblant le RTf. Ces résultats font l'objet du Chapitre V.