

Titre:	Évaluation de l'efficacité des nanoparticules chitosane-siARN à inhiber, in vitro, l'expression du gène MDR1 responsable de la résistance à la chimiothérapie
Auteur:	Mohamed Benhammadi
Date:	2014
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence:	Benhammadi, M. (2014). Évaluation de l'efficacité des nanoparticules chitosane-siARN à inhiber, in vitro, l'expression du gène MDR1 responsable de la résistance à la chimiothérapie [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/1559/
Citation:	

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1559/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Abderrazzak Merzouki, & Michael D. Buschmann
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DES NANOPARTICULES CHITOSANE-siARN À INHIBER, IN VITRO, L'EXPRESSION DU GÈNE MDR1 RESPONSABLE DE LA RÉSISTANCE À LA CHMIOTHÉRAPIE

MOHAMED BENHAMMADI

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

OCTOBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DES NANOPARTICULES CHITOSANE-siARN À
INHIBER, IN VITRO, L'EXPRESSION DU GÈNE MDR1 RESPONSABLE DE LA
RÉSISTANCE À LA CHIMIOTHÉRAPIE

présenté par : BENHAMMADI Mohamed

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., président

M. MERZOUKI Abderrazzak, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. GUERTIN Claude, Ph. D., membre

DÉDICACE

À ma mère, mon père et mes deux frères,

À ma famille et tous mes amis

REMERCIEMENTS

C'est toujours lorsqu'on arrive au bout de chemin qu'on réalise l'envergure du trajet parcouru. Rendu à la fin de ce projet, c'est ainsi que je me sens. Les années de maîtrise marqueront sans doute ma vie personnelle ainsi que professionnelle. Je dois donc des remerciements sincères à mon directeur de recherche Abderrzzak Merzouki qui au-delà de toute attente a fait preuve d'empathie et de patience. La liberté qu'il m'a accordée pour mener ces travaux a constitué pour moi une formation très précieuse. Ses corrections méticuleuses ont contribué sans doute à l'achèvement de ce projet.

Je dois mentionner la grande disponibilité de Dre Myriam Jean et ses conseils judicieux qui étaient pour moi d'une aide considérable pour l'accomplissement de ce travail et le développement de mes connaissances scientifiques. Je tiens également à remercier Daniel Veilleux pour sa disponibilité et sa patience pour mener bien à terme les études de cytométrie en flux.

Je voudrais aussi remercier mes amis qui, avec cette question insistante, « Quand est-ce que tu termines? », bien qu'angoissante en période méandrique, était pour moi une grande source de motivation pour atteindre mon objectif final. Merci à Yuan Chang, Mohamed El-Ariss, Almas Sadiqui, Eddie Magnide, Laurent Bartolo, Nesrine Riahi, Colleen Mathieu, David Fong, Diogo Lopes De Jesus et toute l'équipe du Dr Michael Buschmann.

Un merci tout particulier à Arwa, Amir, Houssam, Souhir, Hassen, François, Louis-Félix et toute la famille de Pizzédelic pour leur agréable compagnie et les bons moments passés ensemble.

Je tiens aussi à remercier ma mère qui m'a guidé tout au long de ce projet avec son amour incessant et son dévouement envers ma réussite. Merci infiniment à mon père qui n'a jamais épargné un effort pour m'aider autant financièrement que psychologiquement. Sans oublier mes frères, que Dieu m'a gâté avec, merci de m'avoir épaulé avec vos encouragements perpétuels malgré la distance qui nous sépare.

Mes remerciements ne peuvent s'achever sans mentionner ma famille qui m'a supporté durant cette épreuve avec leur amour et leur encouragement.

RÉSUMÉ

Depuis la découverte de la Moutarde azotée, premier agent anticancéreux, la chimiothérapie occupe une place importante dans le traitement de plusieurs types de cancer. Malgré le progrès et l'avènement des médicaments anticancéreux, la chimiothérapie est souvent limitée par des mécanismes de résistance développés par les cellules cancéreuses. Parmi les mécanismes les plus répandus est l'expulsion des médicaments anticancéreux à l'extérieur des cellules. Ceci aboutit à une diminution de la concentration intracellulaire du médicament affectant ainsi son activité anti tumoral. L'expulsion des médicaments anticancéreux est causée par la surexpression des protéines membranaires dont la plus connue est la glycoprotéine P (Pgp). L'hydrolyse de l'ATP par cette protéine fournit de l'énergie nécessaire pour assurer un transport actif à travers la membrane plasmique de plusieurs types de molécules anticancéreuses indépendamment de leur structure. Codée par le gène MDR1, la surexpression de la Pgp est détectée chez plus que 50% des patientes atteintes de cancer du sein. Contrairement aux inhibiteurs chimiques, les petits ARN interférents (MDR1-siRNA) sont capables d'inhiber plus spécifiquement la Pgp et contourner la chimiorésistance. Ces petits ARN doubles brins de 21 nucléotides peuvent lier spécifiquement la séquence d'ARN messager du gène MDR1 et engendrer sa dégradation inhibant ainsi la traduction de la Pgp. Cependant, l'efficacité des MDR1-siRNA est limitée par leur vulnérabilité dans le milieu physiologique et leur incapacité à franchir les barrières cellulaires. D'où la nécessité d'un système de livraison pour assurer le potentiel thérapeutique des MDR1-siRNA. Dans ce présent travail, le système de livraison utilisé est le chitosane, un polymère naturel, biodégradable et non toxique.

Le chitosane est caractérisé par son degré de désacétylation (DDA), sa masse moléculaire (MM) et son ratio amine phosphate (N : P). Pour des fins de simplicité, ces paramètres sont décrits de la façon suivante [DDA-MM-N:P]. Étant donné sa charge cationique, le chitosane est capable d'interagir électrostatiquement avec les MDR1-siRNA et former des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La taille et la forme de nanoparticules a été évaluées par diffusion dynamique de la lumière et aussi par microscopie électronique à balayage (ESEM). La mesure du potentiel zêta caractérise la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La formation des nanoparticules et leur stabilité en fonction du pH a été évaluées avec le recours au réactif *RiboGreen* et suite à une migration sur gel de polyacrylamide. La capacité des nanoparticules à

franchir la membrane cytoplasmique a été analysée par microscopie confocale et cytométrie en flux (FACS). Alors que leur efficacité à silençer le gène MDR1 a été évaluée par RT-PCR quantitative et confirmer au niveau phénotypique par *Western blot*. Le test d'Alamar bleu a été réalisé dans le but d'évaluer le profil de toxicité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

Les résultats ont démontré que la taille, la charge et l'efficacité des nanoparticules dépendent des paramètres physicochimiques du chitosane. La taille des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées avec les formulations de chitosane 92-10-5, 92-150-5, 80-10-5 et 82-200-5 varie de 80 à 230 nm en fonction de la masse moléculaire. Alors que, la charge positive de ces nanoparticules augmente en fonction du DDA et du ratio N : P. Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sont stables à pH 6,5 indépendamment du temps d'incubation. Les nanoparticules sont capables de franchir les barrières cellulaires et induire 90% du silençage du gène MDR1. L'efficacité du silençage obtenue dépend de la masse moléculaire du chitosane et ainsi de la méthode de transfection. Le silençage du gène MDR1 a été confirmé au niveau phénotypique par une diminution de l'expression de la Pgp.

Les résultats issus de cette étude révèlent l'efficacité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à inhiber spécifiquement l'expression du gène MDR 1 responsable de la chimiorésistance. L'absence de toxicité, la spécificité et la concrétisation du silençage sur le plan phénotypique ouvrent la voie vers une étude plus approfondie étudiant le rôle des nanoparticules à chimiosensibiliser les cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. Grâce à son pouvoir de livraison génique et son innocuité, le chitosane pourrait être aussi commercialisé comme étant un agent de transfection non toxique pour les cellules concurrençant ainsi les systèmes de livraison lipidique.

ABSTRACT

Since the discovery of nitrogen mustard, the first anticancer agent, chemotherapy has played an important role in the treatment of several types of cancer. Despite the progress and the advancement of anti-cancer drugs, chemotherapy is often limited by resistance mechanisms developed by cancer cells. Among the most common mechanisms is the expulsion of anticancer drugs out of the cells, resulting in a decreased intracellular concentration and lowered antitumor activity. The expulsion of anticancer drugs is mediated by the over-expression of the transmembrane transport protein where the best characterized is P glycoprotein (Pgp). This protein utilize the energy of ATP to actively carry out structurally and functionally unrelated anticancer agents across the plasma membrane. Encoded by the MDR1 gene, the predominant role of Pgp is detected in more than 50 % of breast cancer patient. Unlike chemical inhibitors, small interfering RNAs (MDR1-siRNA) provide a more specific downregulation of Pgp and reversion of the drug resistance. These small double-stranded RNA (21 nucleotides) are able to bind to a specific mRNA sequence of the MDR1 gene, causing its degradation and thereby disabling translation of Pgp. However, the efficiency of MDR1-siRNA is limited by their vulnerability in the physiological medium and their inability to cross cell barriers. For this purpose, a delivery system is needed to potentiate the effect of siRNA. In this study, the delivery system used is chitosan, a natural, biodegradable and non-toxic polymer.

Chitosan is characterized by its degree of deacetylation (DDA), molecular weight (MM) and amine to phosphate (N: P) ratio. For simplicity, these parameters are described as follows [DDA-MM- N:P]. Chitosan is able to interact electrostatically with the MDR1-siRNA due to its cationic charge, leading to chitosan/MDR1-siRNA nanoparticles. The nanoparticles size and morphology was evaluated by dynamic light diffusions (DLS) and scanning electron microscopy (ESEM). Nanoparticles surface charge was characterized by measuring the zeta potential. Furthermore, the formation of chitosan nanoparticles and their stability under variable pH was evaluated by *RiboGreen* and polyacrylamide gel electrophoresis. The nanoparticles ability to bypass cellular membrane was analyzed by confocal microscopy and flow cytometry (FACS). The efficacy of nanoparticles in gene silencing was assessed by quantitative RT-PCR, and confirmed at the phenotypic level by *western blot* analysis. Whereas, the toxicity profile of chitosan nanoparticles was evaluated using Alamar Blue proliferation assay.

The obtained results showed that the size, charge and efficacy of nanoparticles depend on physicochemical parameters of chitosan. The size of the nanoparticles prepared with the following formulations 92-10-5, 92-150-5, 82-200-5 and 80-10-5 increased from 80 to 230 nm, depending on chitosan molecular weight. Whereas the positive charge of the nanoparticles is enhanced with DDA and the N: P ratio. The chitosan nanoparticles are stable at pH 6.5 independently of incubation time. Furthermore, the nanoparticles are able to bypass the cell barriers and efficiently downregulate the MDR1 gene expression. Nanoparticles could induce a higher gene silencing (90% reduction in MDR1) depending on chitosan molecular weight and transfection method. The gene silencing efficiency of the nanoparticles was confirmed by reduced Pgp expression to the same level of sensitive cells.

These results highlight the efficacy of chitosan-siRNA nanoparticles to mediate a specific inhibition of MDR1 gene, responsible for chemoresistance. The absence of toxicity, specificity and the phenotypic silencing of the Pgp, paves the way for further studies to evince the ability of nanoparticles to reverse multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. Due to its effective gene delivery and its safety profile, chitosan could also be marketed as a non-toxic transfection reagent competing with lipid delivery systems.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	4
1.1 Le cancer	4
1.1.1 Les impacts socio-économiques.....	4
1.1.2 Histoire de cancer du sein	4
1.1.3 Généralité sur le cancer	5
1.2 Les principaux traitements conventionnels du cancer du sein	9
1.2.1 Chirurgie.....	9
1.2.2 Radiothérapie	10
1.2.3 Hormonothérapie	10
1.2.4 Chimiothérapie	10
1.3 Résistance multiple aux médicaments (MDR).....	14
1.3.1 Mécanismes généraux	15
1.4 Protéines impliquées dans la résistance multiple aux médicaments	16
1.4.1 Les transporteurs ABC	16

1.5	La thérapie génique et la MDR	22
1.6	Les ARN interférents	23
1.6.1	Histoire	23
1.6.2	Mécanisme d'action des ARN interférents	24
1.6.3	Les défis de la thérapie génique par les ARN interférents	28
1.7	Les méthodes de livraison des siRNA.....	33
1.7.1	Les vecteurs viraux.....	34
1.7.2	Les vecteurs non viraux.....	34
1.8	Les ARN interférents et le silençage du gène responsable de la Résistance Multiple aux Drogues (MDR1)	37
1.8.1	Les systèmes utilisés pour la livraison des siRNA anti-Pgp <i>in vitro</i>	38
1.9	Le chitosane.....	40
1.9.1	Structure et caractéristique du chitosane	41
1.9.2	Le chitosane et la thérapie génique	42
	CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	47
2.1	Hypothèse de recherche	47
2.2	Objectifs	47
2.3	Organisation du projet de recherche.....	48
	CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....	49
3.1	Préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	49
3.1.1	MDR1-siRNA	49
3.1.2	Les formulations de chitosane.....	50
3.2	Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	54
3.2.1	Formation et stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	54

3.2.2 Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	57
3.2.3 Analyse de la taille et des formes des nanoparticules par microscopie électronique à balayage environnemental	57
3.3 Évaluation du potentiel de chitosane comme un système de livraison des siRNA, ciblant le gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr (Étude <i>in vitro</i>)	58
3.3.1 Caractéristique de la lignée cellulaire	58
3.3.2 Culture et passage cellulaires	59
3.3.3 Évaluation de l'expression du gène cible (MDR1) dans les cellules MCF-7/mdr	61
3.3.4 Transfection des cellules avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	63
3.3.5 Évaluation du trafic intracellulaire des nanoparticules chitosane-siRNA et de la délivrance cytoplasmique des siRNA	65
3.3.6 Étude de la toxicité cellulaire des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA en utilisant la technique d'Alamar bleu	68
3.3.7 Évaluation de silençage génique suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	69
3.3.8 Étude phénotypique de silençage génique de la protéine cible (Pgp)	74
3.4 Analyse statistique.....	77
CHAPITRE 4 RÉSULTATS	78
4.1 Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	78
4.1.1 Formation et stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	78
4.1.2 Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	87
4.1.3 Analyse de la taille et des formes des nanoparticules par microscopie électronique à balayage environnemental	92

4.2	Évaluation du potentiel de chitosane comme un système de livraison des siRNA, ciblant le gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr (Étude <i>in vitro</i>)	94
4.2.1	Évaluation de l'expression du gène (MDR1) dans les cellules MCF-7/mdr	94
4.2.2	Évaluation du trafic intracellulaire des nanoparticules chitosane-siRNA et de la délivrance cytoplasmique des siRNA	101
4.2.3	Étude de la toxicité cellulaire des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA en utilisant la technique d'Alamar bleu	110
4.2.4	Évaluation de silençage génique suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	112
4.2.5	Étude phénotypique du silençage génique de la protéine cible (Pgp).....	120
CHAPITRE 5	DISCUSSION	124
5.1	Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA	124
5.2	Évaluation de chitosane comme un système de livraison des siRNA ciblant le gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr (Étude <i>in vitro</i>)	130
CONCLUSION		140
BIBLIOGRAPHIE		142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Classification des médicaments les plus utilisés en chimiothérapie (Tannock & Hill, 1998)	12
Tableau 3.1: Les caractéristiques associées à chaque formulation de chitosane utilisée pour la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.	52
Tableau 4.1: Valeurs présentant la taille, le potentiel zêta et PDI des nanoparticules préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à des ratios N:P 5 et 10.....	89

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: Les principales étapes pour la formation des métastases. (Fidler, 2003)	8
Figure 1-2: Schéma des voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la Doxorubicine (Takemura & Fujiwara, 2007)	14
Figure 1-3: Les différents mécanismes associés au développement de la MDR (Patel, Pattni, Abouzeid, & Torchilin, 2013).....	16
Figure 1-4: Structure de la glycoprotéine P humaine (Ambudkar et al., 1999).	19
Figure 2-1: Organisation et avancement du projet de recherche.....	48
Figure 4-1: Profil de migration électrophorétique des MDR1-siRNA sur gel de polyacrylamide à 13%.....	81
Figure 4-2: Caractérisation de la liaison entre le chitosane et les MDR1-siRNA par l'inhibition de la fluorescence de <i>RiboGreen</i> à pH 6,5 (n=3).....	84
Figure 4-3: Caractérisation de la liaison entre le chitosane et les MDR1-siRNA par l'inhibition de la fluorescence de <i>RiboGreen</i> à pH 7 (n=3).....	85
Figure 4-4: Caractérisation de la liaison entre le chitosane et les MDR1-siRNA par l'inhibition de la fluorescence de <i>RiboGreen</i> à pH 8 (n=3).....	86
Figure 4-5: Influence de la variation de la MM du chitosane sur la taille des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. (n=3, p**<0,01).	90
Figure 4-6: Influence de la variation de DDA du chitosane sur la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. (n=3, p**<0,01, p*<0,05).....	91
Figure 4-7: Images des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA en microscopie électronique.	93
Figure 4-8: Les séquences des quatre duplex MDR1-siRNA utilisés en cocktail et fournies par Dharmacon sous le nom de «siGENOME SMART pool».....	96

Figure 4-9: Profil de migration électrophorétique des produits de la RT-PCR sur un gel d'agarose à 3%	97
Figure 4-10: Séquence de 4718 acides nucléiques de l'ARNm du gène MDR1 humain codant pour la protéine Pgp. Référence NCBI de la séquence : NM_000927.	99
Figure 4-11: Séquence de 1280 acides aminés de la protéine Pgp humaine. Référence NCBI de la séquence : NM_000927.	100
Figure 4-12: Pourcentage des cellules transfectées par les nanoparticules chitosane-siGLO préparées avec le chitosane caractérisé par MM et DDA différents (n=2, p**<0,01).	103
Figure 4-13: Moyenne de la fluorescence des nanoparticules chitosane-siGLO internalisées par les cellules MCF-7/mdr (n=2, p**<0,01).....	104
Figure 4-14: Observation de l'internalisation des nanoparticules chitosane-siGLO et la libération des siGLO à l'intérieur des cellules MCF-7/mdr.	109
Figure 4-15 : Effet des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sur l'activité métabolique des cellules MCF-7/mdr. (n=2, p**<0,01)	111
Figure 4-16 : Profil d'un ARN total de haute qualité (RIN=9.7) généré par le système d'électrophorèse capillaire sur puce (Bioanalyser 2100 d'Agilent).	114
Figure 4-17: Quantification relative du niveau de l'expression de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr transfectées par DharmaFECT/MDR1-siRNA et les cellules MCF-7 sensibles (n=2, p*<0,05).	116
Figure 4-18: Niveau de silençage génique du gène MDR1 suite à la transfection avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA (n=2, p**<0,01).....	119
Figure 4-19: Analyse de l'expression de la Pgp par <i>Western blot</i> suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR-siRNA.	122

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

6-FAM	6-carboxyfluorescéine (<i>6-carboxyfluorescein</i>)
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNase	Désoxyribonucléase
ADNc	ADN complémentaire
ADNp	ADN plasmidique
ADR	Adryamicine
AGO2	Argonaute 2
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase
ARNdb	ARN double brin
ARNi	Interférence par ARN (<i>RNA interference</i>)
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN totaux
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CPG	Chromatographie sur gel perméable
C _t	Cycle seuil (<i>cycle threshold</i>)
DDA	Degré de désacétylation
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (<i>dynamic light scattering</i>)
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DOX	Doxorubicine

ECL	Chimioluminescence améliorée (<i>Enhanced chemiluminescence</i>)
EGFP	Protéine fluorescente verte (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ESEM	Microscopie électronique à balayage environnemental (<i>environmental scanning electron microscopy</i>)
FBS	Sérum de veau fœtal (<i>Fetal bovine serum</i>)
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GlcN	D-glucosamine
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
¹ H RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
MRP	<i>Multidrug Resistance Associated Protein</i>
miARN	Micro ARN
MM	Masse moléculaire
MDR	Multirésistance aux médicaments (<i>Multi-Drug Resistance</i>).
NBF	<i>Nucleotide Binding Folds</i>
N:P	Charge chitosane/acides nucléiques (amine:phosphate).
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PDI	Indice de polydispersité (<i>polydispersity index</i>)
pDNA	ADN plasmidique
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
Pgp	Glycoprotéine Phosphate (glycoprotéine P)
PKC	Protéine kinase C
PKR	Protéine kinase dépendante de l'ARN
PLL	Polylysine
Pré-miARN	Micro ARN précurseur

Pri-miARN	Micro ARN primaire
qRT-PCR	Amplification quantitative en chaîne par polymérase en temps réel (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RES	Système réticulo-endothélial (<i>Reticuloendothelial System</i>)
RIG-I	Gène 1 inducible par l'acide rétinoïque (<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>)
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RISC	Complexe de silençage induit par l'ARN (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RTIC	Rhodamine B isothiocynate
shARN	Petit ARN épingle à cheveux (<i>small hairpin RNA</i>)
siARN	Petit ARN interférent (<i>small interfering RNA</i>)
SNALP	Particules lipides/acides nucléiques stables (<i>stable nucleic acid-lipid particles</i>)
TLR	<i>Toll-like receptors</i>

INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez les femmes à travers le monde. Chaque année environ 200.000 nouveaux cas sont détectés aux États-Unis (McArthur & Hudis, 2007). La recherche scientifique pour la lutte contre le cancer du sein a permis de marquer d'immense progrès dans ce domaine menant au développement de plusieurs traitements (chimiothérapie, chirurgie, radiothérapie, immunothérapie). Néanmoins, la chimiothérapie demeure le meilleur moyen thérapeutique pour lutter contre ce type de cancer puisqu'elle permet d'améliorer le contrôle locorégional du cancer et la survie des patientes atteintes (Cassady & Douros, 1980; Mittendorf et al., 2013; Swain et al., 2010). Généralement administrée par voie intraveineuse, la chimiothérapie consiste à utiliser des médicaments anti-tumoraux pour ralentir ou empêcher le développement des cellules cancéreuses et diminuer le risque des métastases. Ces médicaments anti cancéreux sont classés en plusieurs catégories selon leur nature chimique et leurs modes d'action. Cependant, la résistance aux médicaments anticancéreux représente le plus grand défi apporté à la chimiothérapie des cancers. Une exposition à une seule molécule anticancéreuse peut induire une résistance contre toute une classe de molécules. Ce phénomène est appelé une résistance multiple aux drogues (MDR) (Ford, 1990; Shukla, S, Ohnuma, & Ambudkar, 2011; Wind & Holen, 2011). Les mécanismes moléculaires les plus importants expliquant ces phénomènes de résistance sont associés la surexpression des protéines membranaires (famille des transporteurs ABC) qui entraînent un flux des médicaments du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, en utilisant l'énergie fournie suite à l'hydrolyse de l'ATP. La concentration intracellulaire du médicament anti-cancéreux est donc diminuée réduisant ainsi son efficacité. Parmi ces transporteurs membranaires le plus importants est la glycoprotéine P (Pgp). En effet, cette protéine a été l'un des premiers transporteurs mis en évidence dans les phénomènes de résistance des cellules cancéreuses aux drogues (Juliano, R. L. & Ling, 1976; Leschziner, Andrew, Pirmohamed, & Johnson, 2006; Sui, Fan, & Li, 2012). La Pgp est codée par le gène MDR1 localisé sur le chromosome 7 (Ambudkar et al., 1999), la Pgp joue un rôle important dans l'expulsion de plusieurs molécules anti-tumorales (Dai et al., 2010). En conséquence, des inhibiteurs chimiques de la Pgp ont été développés afin de bloquer son action et augmenter ainsi la concentration des agents chimiothérapeutiques dans les tumeurs surexprimant cette protéine. Ces inhibiteurs, classés en trois générations distinctes, présentent cependant plusieurs complications graves telles que l'hypotension, l'immunosuppression et

l’insuffisance cardiaques (Akhtar et al., 2011; Ferry, Traunecker, & Kerr, 1996; Thomas & Coley, 2003) .Cependant, le développement d’autres méthodes plus efficace et moins toxiques, telles la thérapie génique, serait une stratégie prometteuse pour contourner la résistance tumorale aux drogues.

Une des approches innovatrices de la thérapie génique est de cibler l’ARNm du gène MDR1 pour bloquer l’expression de la Pgp (Abbasi, Meysam, Lavasanifar, & Uluda˘, 2013; Lage, 2005b). Cette stratégie a pour but d’augmenter la sensibilité des cellules tumorales à l’effet des drogues chimiothérapeutiques (chimiosensibilité) tout en diminuant leurs effets indésirables. Dans ce cadre, plusieurs approches comme les ribozymes et les oligonucléotides anti sens ont été testés pour réduire le niveau d’expression du gène MDR1. Néanmoins, leur efficacité était limitée lors des études cliniques (Abbasi, Meysam et al., 2013; Amiji, Hor nicek, & Duan, 2011; Nagata et al., 2002; Ramachandran & Wellham, 2003). Le recours récent aux petits ARN interférents (siRNA) représente une stratégie encourageante et prometteuse pour diminuer et contrôler le niveau d’expression du gène MDR1. Ces petits ARN doubles brins de 21 nucléotides peuvent se lier spécifiquement à une séquence d’ARNm par complémentarité de base et engendrer sa dégradation permettant l’inhibition et le contrôle de la traduction de la protéine cible (Pgp) via un mécanisme moléculaire intracellulaire très spécifique.

Bien que la technologie siRNA soit une excellente approche pour contourner la résistance multiple aux drogues des cellules cancéreuses, plusieurs défis doivent être surmontés pour assurer une application efficace. Notamment, les défis associés à l’instabilité des siRNA dans le milieu physiologique où ils sont rapidement dégradés par les nucléases. En outre, ils sont incapables de traverser la membrane plasmique à cause de leur charge anionique. De ce fait entre autres, l’utilisation d’un système de livraison est nécessaire pour garantir leur pouvoir thérapeutique. Cependant, certains systèmes de livraison sont associés à une cytotoxicité élevée (Suhorutsenko et al., 2011; Zhong et al., 2008). Donc, le système de livraison choisi doit être à la fois sécuritaire et efficace pour livrer les siRNA au niveau du cytosol et assurer leur pouvoir de silençage des ARNm cibles.

Dans le présent travail, le système de livraison utilisé est le chitosane, un polymère naturel, biodégradable et non toxique. Ce biopolymère peut interagir électrostatiquement avec les siRNA à cause de sa charge cationique et aboutissant à la formation des nanoparticules chitosane-siRNA dont la taille et la stabilité dépendent énormément des paramètres

physicochimiques du chitosane (Buschmann et al., 2013; Katas & Alpar, 2006; Mao, S., Sun, & Kissel, 2010). Les formulations du chitosane diffèrent par leur degré de déacétylation (DDA), leur masse moléculaire (MM) ainsi leurs ratios amine : phosphate (N:P). Le degré de déacétylation (DDA) représente la densité de charge positive, la masse moléculaire (MM) représente la longueur du polymère et le ratio N : P représente la quantité de chitosane par rapport aux siRNA. Tout au long de ce mémoire, ces paramètres, caractérisant les formulations de chitosane, seront décrits de la façon qui suit [DDA-MM-N:P]. Par exemple, la formulation de chitosane 92-10-5 représente une formulation ayant 92% de DDA, 10kDa en MM et 5 en ratio N : P.

Dans cette étude la taille de nanoparticules a été évaluée par microscopie électronique à balayage (ESEM) et aussi par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La mesure du potentiel zêta caractérise la charge des nanoparticules. De plus, leur stabilité a été évaluée à différents pH et à différents temps d'incubation, alors que le profil de toxicité des nanoparticules a été évalué avec le test Alamar bleu. L'évaluation du taux de silençage génique de la Pgp a été effectuée par PCR quantitative (qPCR) sur l'ARNm des cellules MCF-7/*mdr* transfectées par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. En outre, le *western blot* a été réalisé afin de confirmer au niveau phénotypique l'effet de silençage sur l'expression protéique de la Pgp par les cellules MCF-7/*mdr* transfectées.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le cancer

1.1.1 Les impacts socio-économiques

À partir des données provenant du registre canadien du cancer (RCC), statistique canada estimait que 186 400 nouveaux cas de cancer et 75 700 décès causés par cette maladie surviendront au Canada en 2012. Toutes les heures, chaque jour, en moyenne 21 personnes recevront un diagnostic de cancer et 9 personnes mourront de cette maladie. Les études statistiques ont montré que le Québec représente la province qui contient les taux d'incidence et de mortalité les plus élevés au Canada.

Le cancer le plus couramment diagnostiqué chez les femmes demeure le cancer du sein avec 22700 nouveaux cas attendus ce qui va représenter avec le cancer de la prostate, cancer de poumon et cancer colorectal 53% de tous les cancers diagnostiqués au Canada. De plus, le Québec reste la province qui contient le taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein le plus élevé au Canada. Le cancer représente un fardeau économique pesant pour la société québécoise avec un coût estimé à près de 3.5 milliards de dollars (www.cancer.ca).

1.1.2 Histoire de cancer du sein

Le cancer de sein est connu depuis l'antiquité et tel que prouvé par les traces archéologiques. Transcrits sur des feuilles de papyrus datées de milliers d'années avant J.C, les dossiers de la médecine égyptienne contenaient des observations sur le gonflement mammaire et la présence de masses solides. Le seul traitement décrit dans ces documents archéologiques est l'excision de ces masses (Ebbell, 1937; Feldman & Goodrich, 1999). En outre, 500 ans avant J.C, la masse solide au niveau du sein avec les « racines » dans les tissus environnants a été considérée comme grave par les médecins grecs de l'époque. La nature en forme de crabe a été notée par Hippocrate qui a utilisé le mot carcinos (crabe) pour décrire la façon avec laquelle le cancer développe des prolongements qui ressemblent aux pattes des crabes. Le philosophe a préconisé aussi des explications du cancer de sein en évoquant ses capacités invasives. Le cancer du sein émerge selon lui suite un dérèglement de la bile noire et le flux sanguin au niveau du sein (Retief & Cilliers, 2011). Les manuscrits issus de l'Europe occidentale et du proche orient

montrent que la chirurgie, la cautérisation et les pâtes caustiques ont été adaptées pour lutter contre le cancer. Les saignées (phlébotomie), l'alimentation, les médicaments à base de plantes, la poudre de crabe ont été également utilisés, mais aucune preuve n'a démontré leur efficacité. Il a fallu attendre le dix-septième siècle pour que Wilhelm Fabricus décrive adéquatement les opérations chirurgicales effectuées sur le cancer de sein et d'autres cancers (Kiple, 2003). En effet, les premiers rapports dans la littérature scientifique déployant les caractéristiques de plusieurs tumeurs distinctes ont eu lieu seulement au cours des 200 dernières années. Les exemples incluent le cancer du scrotum chez les ramoneurs en 1775 (Schottenfeld & Fraumeni, 2006), le cancer du nez chez les consommateurs de tabac en 1761 (Redmond Jr, 1970) et le lymphome de Hodgkin en 1832 (Holleb & Randers-Pehrson, 1775).

1.1.3 Généralité sur le cancer

Les cellules normales qui possèdent chacune un rôle particulier dans un tissu du corps humain, se croissent, se divisent et se meurent selon un cycle très bien ordonné. Cette division est physiologiquement soumise à de nombreux facteurs de contrôle du cycle cellulaire. Parmi les facteurs qui contrôlent le cycle cellulaire, on trouve les deux familles de gènes : les proto-oncogènes et les anti-oncogènes (ou gènes suppresseurs de tumeurs). Les premiers sont les régulateurs positifs du cycle cellulaire alors que les seconds sont des inhibiteurs de la croissance cellulaire (Jayr & Muret, 2010). Par exemple, en cas de lésion cutanée, des facteurs de croissance agissent sur les proto-oncogènes. Ces gènes expriment alors des protéines qui vont amorcer la division de la cellule. Une fois la cicatrisation achevée un signal sera transmis aux anti-oncogènes pour freiner la division cellulaire (Martin, 1997). Ainsi, la prolifération des cellules saines de l'organisme est strictement limitée à leur emplacement et l'inhibition de contact limite donc le nombre de divisions et empêche toute croissance excessive du tissu.

Des mutations peuvent intervenir sur tout type de gènes y compris ceux qui contrôlent le cycle cellulaire suite à une exposition à des agents mutagènes (par exemple, rayon UV ou X, solvant chimique et même certains virus). Une activation du système de réparation de l'ADN est nécessaire pour corriger les erreurs induites et garder le tissu sain, sinon la mutation conduit la cellule vers une mort programmée ou apoptose (Wyllie, 1993). Dans d'autres cas, la mutation d'un proto-oncogène le rend plus actif et il devient un oncogène (Milyavsky et al., 2005). De même, la mutation d'un anti-oncogène rend celui-ci inactif. Ce processus conduit au

développement d'une néoplasie qui peut-être soit une tumeur bénigne ou soit une tumeur maligne (Lazebnik, 2010). Le processus tumoral peut être décrit en quatre étapes successives. **Une phase d'initiation** qui dure plusieurs années durant laquelle une cellule subit une série de mutations sur plusieurs gènes parmi ceux-ci des proto-oncogènes (comme le gène *ras*) et des anti-oncogènes (comme le gène P53) aboutissant à un défaut de régulation du cycle cellulaire (Milyavsky et al., 2005). En effet, une cellule mutée échappe des signaux qui règlent sa multiplication, sa différenciation et aussi le déclenchement de son apoptose (Kastan, Canman, & Leonard, 1995). **La phase de promotion** est caractérisée par la multiplication excessive des cellules mutées pour former des clones de cellules tumorales associés à une hypertrophie cellulaire et une instabilité génétique importante. Certaines néoplasies augmentent de masse, mais ne subissent pas de nouvelles mutations constituant les tumeurs bénignes. L'accumulation de nouvelles mutations accélère la prolifération cellulaire et la transformation des cellules en tumeurs malignes. **La phase de progression** est caractérisée par une invasion loco-régionale, dans une tumeur maligne les cellules sont dédifférenciées et perdent les caractéristiques de leur tissu d'origine (Stoecklein & Klein, 2010). La croissance et le maintien de la prolifération des cellules tumorales dépendent de l'approvisionnement en oxygène, en nutriments et de l'évacuation des déchets métaboliques. Ainsi, la prolifération importante des cellules tumorales crée un état d'hypoxie qui nécessite la mise en place de réponses cellulaires adaptées et coordonnées. En situation hypoxique, les cellules tumorales sécrètent des protéines pro-angiogénique comme le facteur de croissance endothérial vasculaire (VEGF) aboutissant ainsi à la néoformation de vaisseaux sanguins irriguant la tumeur et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (VEGF avait été initialement nommé « *vascular permeability factor* » par Dvorak) (Senger et al., 1983). Cette perméabilisation augmente la diffusion du serum et des protéines plasmatiques contribuant à la formation d'une matrice extracellulaire dans laquelle les vaisseaux nouvellement formés peuvent s'intégrer. De plus, la sécrétion de collagénases, de protéases et de l'activateur du plasminogène, cause la destruction de la membrane basale. Des cellules endothéliales sont alors libérées et leur prolifération conduit à la formation d'un nouveau vaisseau bourgeonnant à partir du vaisseau parental (Le Bras et al., 2006). Cette nouvelle irrigation évite une hypoxie locale et favorise le développement du cancer *in situ*. Les cellules cancéreuses perdent leur « inhibition de contact » et peuvent envahir tout l'espace disponible dans le tissu atteint, et s'étendre dans les tissus environnants sains. Dans **la phase d'invasion**, quelques cellules cancéreuses quittent le foyer

primitif et se biodistribuent dans l'organisme via la circulation sanguine et s'implantent dans certains organes pour former des métastases. Cette capacité d'invasion est associée à une diminution de l'expression des protéines responsable de la formation des jonctions adhérentes intercellulaires (E-cadherine). En effet, la diminution de l'expression de la E-cadhérine accentue ce phénotype alors que sa surexpression est connue comme un antagoniste de l'invasion et de la métastase des cellules cancéreuses (Berx & Van Roy, 2009; Cavallaro & Christofori, 2004).

Le processus de l'invasion et la métastase est toujours présenté sous forme d'un phénomène séquentiel, requérant un certain nombre d'étapes successives appelées « la cascade de l'invasion métastatique » (Fidler, 2003; Talmadge & Fidler, 2010). Cette représentation schématique implique une succession des changements biologiques qui commence par l'invasion locale, puis l'intravasation des cellules cancéreuses dans les capillaires lymphatiques et les capillaires sanguins, transit des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine et la circulation lymphatique suivie de leur échappement de la lumière des vaisseaux pour migrer vers le parenchyme d'autre tissu éloigné (extravasation) où elles forment des foyers secondaires de tumeurs malignes (les métastases).

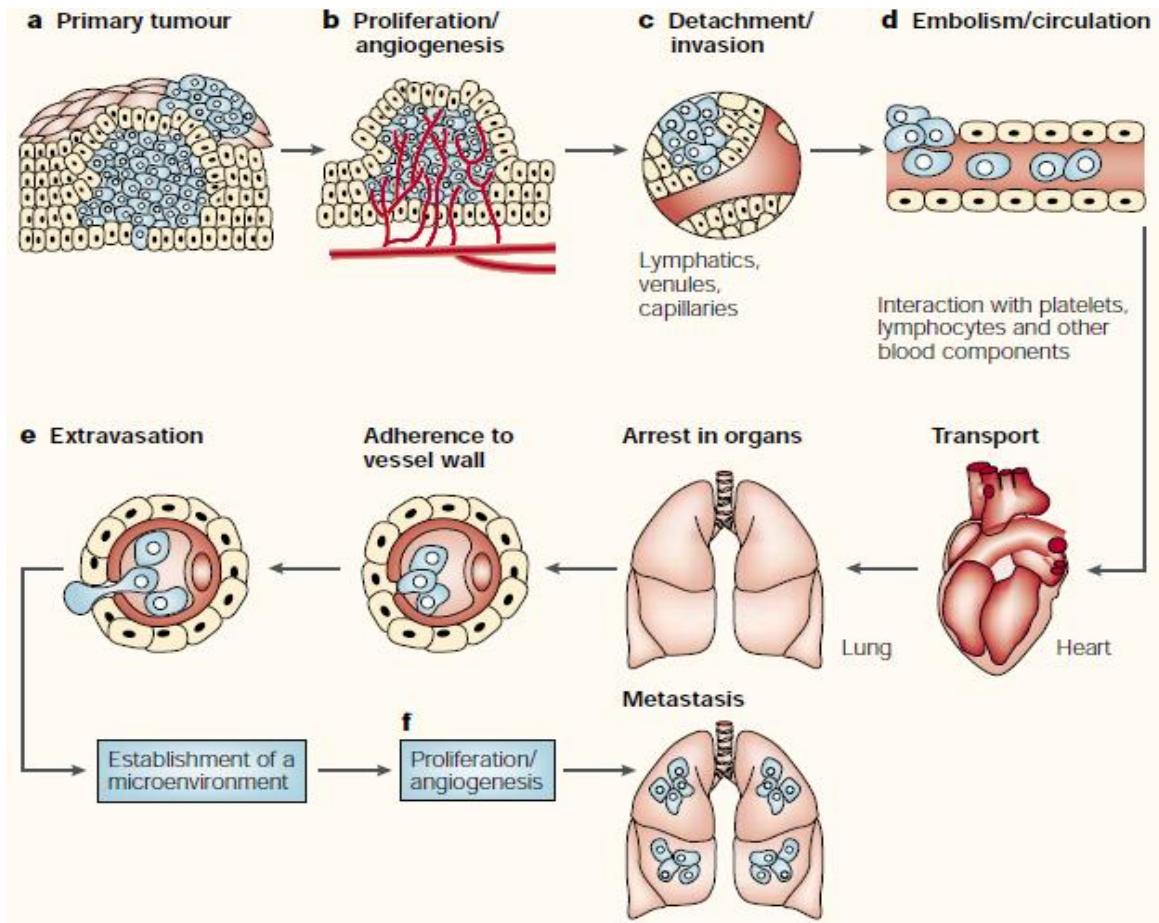


Figure 1-1: Les principales étapes pour la formation des métastases. (Fidler, 2003)

1.2 Les principaux traitements conventionnels du cancer du sein

Le sein, une glande exocrine, est constitué de deux compartiments : le compartiment mésenchymateux qui contient les vaisseaux sanguins et les nerfs, et le compartiment épithelial qui entoure un réseau des lobules et de canaux galactophores qui s'ouvrent à l'extérieur au niveau du mamelon. Les deux compartiments sont séparés d'une membrane basale de collagène, de laminine et de glycosaminoglycans (Rudland, Fernig, & Smith, 1995). Cette structure de sein se développe tout au long de la vie, du stade foetal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles et d'un certain nombre de facteurs de croissance. Cette évolution constante de la glande mammaire et l'augmentation du nombre de cellules en différenciation au sein de cet organe le rend plus sensible au processus de cancérisation

1.2.1 Chirurgie

La mastectomie est une ablation chirurgicale, partielle ou totale, d'un sein ou des deux. La mastectomie radicale (qui consiste à enlever tout le sein), introduite par Halsted depuis 114 ans, était le traitement de premier choix pour le cancer du sein indépendamment de la taille et du type de tumeur et quel que soit l'âge de la patiente (Halsted, 1898). Tout au long de cette période (1892-1973), la mastectomie de Halsted a été toujours effectuée suivant la première description donnée. Malgré quelques modifications telles qu'élargissement de l'étendue de la dissection pour enlever les ganglions lymphatiques mammaires internes ou sa restriction afin d'épargner les muscles pectoraux, la possibilité d'essayer une intervention chirurgicale qui permet de conserver le sein n'a pas été considérée durant ces années (Arzt, 1927; Keynes, 1937). Initiée en 1969, une étude approuvée par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) compare la mastectomie radicale avec la chirurgie mammaire conservatrice (quadrantectomie). Les données préliminaires de cette étude, publiées en 1977 et 1981, montrent un taux de survie égal entre les deux types d'intervention (Veronesi, 1977; Veronesi et al., 1981). En effet, chez les femmes présentant un cancer de sein invasif, la chirurgie conservatrice est au moins aussi efficace que la mastectomie totale. Pour ce motif, la chirurgie conservatrice serait le traitement de choix, car elle peut garantir des bons résultats oncologiques et esthétiques améliorant ainsi la qualité de vie des patientes.

1.2.2 Radiothérapie

La radiothérapie est généralement utilisée pour diminuer le risque d'une récidive suite à une mastectomie. Elle consiste à l'utilisation de l'énergie provenant de rayon X, de rayons gamma, d'électrons et d'autres sources d'énergie pour détruire les cellules cancéreuses. La radiothérapie est une méthode couramment utilisée pour traiter divers types de cancer. L'ADN reste la cible la plus importante de la radiothérapie (Pawlik & Keyomarsi, 2004). En effet, l'irradiation induit des cassures double et simple brin de la molécule d'ADN induisant une mort cellulaire soit par apoptose ou par nécrose (Bergman & Harris, 1997; Savage, 1984).

1.2.3 Hormonothérapie

Le traitement hormonal a pour objectif d'inhiber l'action prolifératrice des hormones féminines au niveau des cellules cancéreuses. L'hormonothérapie contribue à la réduction du risque de récidive local ou à distance du cancer hormono-dépendant. En effet, les récepteurs des œstrogènes et des progestérones sont des cibles majeures de l'hormonothérapie. Le dosage de ces récepteurs permet de déterminer alors la probabilité du cancer à répondre à un traitement hormonal. Un cancer de sein exprime des récepteurs d'estrogène et/ou de progestérone est un cancer hormono-dépendant et il a une grande probabilité de répondre à un traitement hormonal. Dans le cas inverse, la tumeur hormono-indépendante n'exprime pas ces récepteurs et l'hormonothérapie serait inefficace.

1.2.4 Chimiothérapie

La chimiothérapie doit sa naissance au gaz de moutarde dont les propriétés leucopéniantes (diminution du taux de globules blancs) et ulcérantes ont été découvertes durant la seconde guerre mondiale chez les soldats exposés à ce type de gaz. Parallèlement en 1946, Alfred Gilman testait la moutarde azotée (Vonderheid, 2003) chez un patient porteur de lymphosarcomes. Cette date marque le début de la chimiothérapie.

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de médicaments antinéoplasiques pour prévenir et inhiber le développement de cancer. La chimiothérapie possède un rôle central dans le traitement du cancer du sein. En effet, il existe plusieurs médicaments utilisés seuls ou en association. En outre, ces médicaments peuvent être administrés avant et après la chirurgie.

Avant la chirurgie, on parle de chimiothérapie néo-adjuvante dont la décision de traitement dépend de la taille et la localisation du cancer de sein. Ce traitement a pour but de diminuer la masse tumorale et éviter une intervention chirurgicale. Après la chirurgie, on parle de chimiothérapie adjuvante qui dépend des caractéristiques de la tumeur. Cette chimiothérapie préventive a pour but de diminuer le risque de rechute. Le traitement avec la chimiothérapie est associé à plusieurs effets secondaires qui dépendent du type de protocole appliqué. Un choix de type de protocole serait alors nécessaire pour diminuer les effets secondaires (Monsuez, Charniot, Vignat, & Artigou, 2010). La chimiothérapie anti-tumorale compte environ une cinquantaine de médicaments disponibles (Tableau 1). La plupart de ces médicaments agissent sur les cellules tumorales au moment de la division, en agissant au niveau du cycle cellulaire. Ces médicaments sont classés en plusieurs catégories selon leur mode d'action.

- **Les agents alkylants :** Ces médicaments utilisés dans le traitement de cancer agissent en attachant un groupement alkyle (C_nH_{2n+1}) à la molécule d'ADN au niveau d'une base guanine sur l'azote en position 7 du cycle purine. L'alkylation empêche alors la réPLICATION de l'ADN et par conséquent l'inhibition du cycle cellulaire (Brookes & Lawley, 1961). Parmi les agents alkylants, on trouve le gaz de moutarde.
- **Les anti-métabolites :** Ces médicaments entrent en compétition avec un substrat d'une enzyme nécessaire pour la synthèse de l'ADN. L'anti métabolite le plus utilisé en chimiothérapie anticancéreuse est le methotrexate (MTX). Ce médicament inhibe la synthèse de l'acide folique indispensable pour la synthèse des bases nucléiques qui sont essentielles pour la synthèse d'ADN et la division cellulaire (Frei, Jaffe, Tattersall, Pitman, & Parker, 1975).
- **Produit naturel et leurs dérivés** le nom de ce groupe indique la source de l'agent. Cette catégorie regroupe les anthracyclines qui sont isolés à partir des bactéries. Les anthracyclines s'intercalent entre les paires de base azotées de l'ADN et inhibent l'activité de la topoisomérase II.

Tableau 1.1: Classification des médicaments les plus utilisés en chimiothérapie (Tannock & Hill, 1998)

<u>Les agents alkylants</u>	<u>Produits naturels et leurs dérivés</u>
Moutarde azotée	<u>Anthracyclines</u>
Cyclophosphamide	Doxorubicine
Chlorambucil	Daunorubicine
Melphalan	Epirubicine
Mitomycine C	Mitoxantrone
Ifosfamide	Actinomycine D
Busulfan	Bleomycine
Nitroso-urée	
BCNU	
CCNU	
Méthyle CCNU	
<u>Antimétabolites</u>	<u>Alkaloides vinca</u>
Méthotrexate	Vinblastine
5-Fluorouracil	Vincristine
Cytosine Arabinoside	Vindesine
6-Thioguanine	Vinorelbine
6-Mercaptopurine	Etoposide
Gemcitabine	Camptothecins
	<u>Taxanes</u>
	Paclitaxel
	Docetaxel

1.2.4.1 La Doxorubicine

La Doxorubicine (appeler également adryamicine (ADR)) est l'un des agents le plus utilisés dans la chimiothérapie des cancers. La Doxorubicine (DOX) est le médicament de premier choix pour le traitement de cancer du sein. Elle induit une régression tumorale chez 43% des patientes atteintes de cancer du sein (Harris, Morrow, & Norton, 1997). Étant donné son importance dans la chimiothérapie du cancer de sein, la Doxorubicine a été utilisée dans ce présent travail de maîtrise. Cette molécule a été isolée pour la première fois à la fin de l'année 1960 et appartient à la famille des anthracyclines qui sont initialement isolés à partir des produits de fermentation d'une bactérie de genre de *Streptomyces peucetus* (Hande, 1998; Weiss, 1992). Approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974, la Doxorubicine était considérée comme le médicament anticancéreux le plus connu et le plus efficace dans le traitement de divers types de cancers (Mizutani, Tada-Oikawa, Hiraku, Kojima, & Kawanishi,

2005). Pour prévenir sa dégradation et pour atteindre rapidement la tumeur, l'administration de la Doxorubicine se fait par injection intraveineuse. En outre, cette molécule présente une demi-vie plasmatique courte environ 5.3 min (Rahman, Carmichael, Harris, & Roh, 1986). La biotransformation de la Doxorubicine se fait principalement au niveau du foie. La Doxorubicine est majoritairement éliminée par voie hépatobiliaire avec plus que 50% excrétée dans la bile dans les sept jours suivant le traitement. De plus, environ 12% de la dose totale est retrouvé dans les urines 6 jours après le traitement, ce qui explique leurs colorations rouges (Danesi, Fogli, Gennari, Conte, & Del Tacca, 2002). L'action anti-prolifératrice de la Doxorubicine est due à plusieurs mécanismes d'action et plusieurs cibles moléculaires. Principalement, la Doxorubicine possède un caractère lipophile et une grande affinité à l'ADN, ce qui explique sa diffusion passive à travers la membrane cellulaire et son accumulation nucléaire qui est 50 fois plus importante que dans le cytoplasme cellulaire. Sa structure plane et sa concentration nucléaire importante lui permettent d'être insérée chaque 5 paires de base modifiant ainsi la structure de l'ADN (Gigli et al., 1989; Zunino, Gambetta, Di Marco, & Zaccara, 1972). Cette modification de l'ADN cause l'inhibition du topoisomérase II, enzyme nucléaire qui contrôle la torsion et l'enroulement des deux brins de la molécule d'ADN afin de faciliter la transcription, la réplication et la mitose (Potter & Rabinovitch, 2005). L'inhibition de la topoisomérase II par l'intercalation de la Doxorubicine induit l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase G1 et G2 et le déclenchement de l'apoptose cellulaire (Potter & Rabinovitch, 2005). En outre, la dégradation de la Doxorubicine entraîne la libération des radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et la radicale hydroxyle (OH) (Takemura & Fujiwara, 2007) (Figure 1-2). Ces radicaux libres peuvent endommager l'ADN et augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale, ce phénomène est appelé la transition de perméabilité mitochondriale (MPT). En effet, la MPT facilite la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie dans le cytosol aboutissant ainsi à l'activation des caspases, protéines responsables de l'apoptose (Mizutani et al., 2005). L'utilisation de la Doxorubicine est associée à plusieurs effets secondaires. La cardotoxicité reste l'effet toxique le plus important causé par ce médicament et sa famille des anthracyclines (Hrdina et al., 2000). La cardotoxicité est cumulative, elle est détectée après l'administration de plusieurs doses. À des doses cumulées inférieures à 550 mg/m^2 , l'insuffisance cardiaque est observée chez 7% de patients et les lésions cardiaques sont observées durant ou plusieurs mois après le traitement. De plus, la cardotoxicité

est accentuée avec l'augmentation de la concentration du médicament (Steinherz, Steinherz, Tan, Heller, & Murphy, 1991).

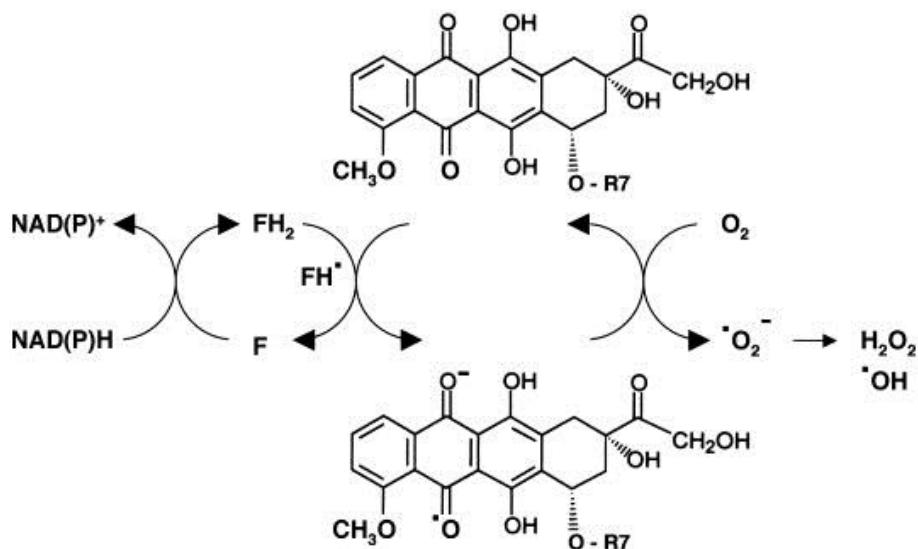


Figure 1-2: Schéma des voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la Doxorubicine (Takemura & Fujiwara, 2007)

1.3 Résistance multiple aux médicaments (MDR)

En plus de sa toxicité, la chimiothérapie est associée à des phénomènes de résistance qui limitent son utilisation. En effet, les cellules cancéreuses développent plusieurs mécanismes moléculaires de défense contre les traitements curatifs de la chimiothérapie. La résistance intrinsèque aux agents antinéoplasiques apparaît d'emblée lors des séances de la chimiothérapie. Alors que la résistance acquise survient suite au traitement à la chimiothérapie et se caractérise par la progression de la tumeur après une phase de chimiosensibilisation (Meschini et al., 2000). La multirésistance aux agents chimiothérapeutiques (*MDR*) est peut-être définie comme étant la capacité des cellules cancéreuses exposées à une seule molécule anticancéreuse de développer

une résistance contre toute une classe de molécule structuralement et fonctionnellement différente (Ford, 1990). Ce phénomène se manifeste par plusieurs mécanismes moléculaires dont on cite les plus importants.

1.3.1 Mécanismes généraux

La résistance à la chimiothérapie peut être associée à une élévation des activités glutathion S-transférase (GST) et des concentrations de glutathion (GSH) intracellulaire. Certes, le système glutathion joue un rôle dans la détoxication et d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ce système peut contribuer à la résistance par plusieurs mécanismes. Parmi ces mécanismes, l'inactivation de la Doxorubicine par la conjugaison directe au GSH catalysé par le glutathion S-transférase réduisant ainsi son effet毒ique pour les cellules cancéreuses (Townsend & Tew, 2003). Une autre voie de la résistance aux agents anticancéreux est la modification des cibles cellulaires de la chimiothérapie telles que les topoisoméraseII. Cet enzyme, nécessaire pour l'enroulement de l'ADN, est une cible de la Doxorubicine. Sa dégradation peut diminuer alors la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux tels que les anthracyclines (Chen, M. & Beck, 1995). De plus, l'acidification de certains organites cellulaire peut entraîner une redistribution des agents anticancéreux à l'intérieur des cellules cancéreuses limitant ainsi leur efficacité (Belhoussine, Morjani, Sharonov, Ploton, & Manfait, 1999). L'altération de la voie d'apoptose et la modification du profil lipidique des cellules cancéreuses possèdent aussi un rôle dans la résistance multiple aux médicaments (MDR) (Morjani et al., 2001)

La MDR se manifeste aussi par la surexpression de protéines membranaires de la famille ABC (*ATP-binding cassette*) dont les plus importantes sont la glycoprotéine P (Pgp), la Multidrug Resistance Associated Protein (MRP1) (Cole et al., 1992) et plus récemment la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) (Doyle et al., 1998).

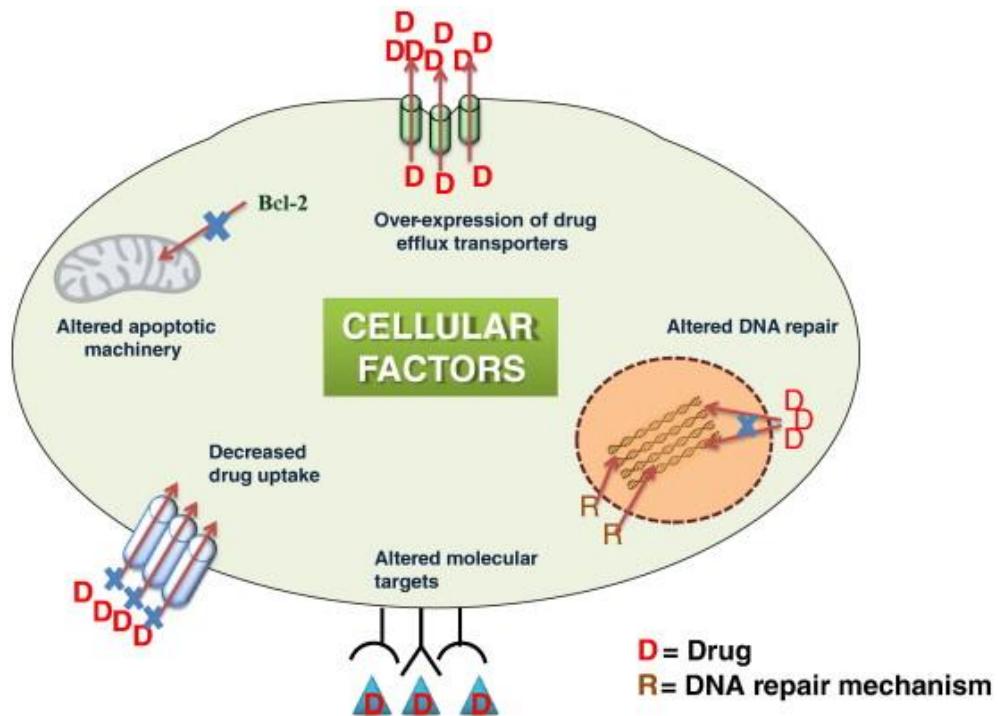


Figure 1-3: Les différents mécanismes associés au développement de la MDR (Patel, Pattni, Abouzeid, & Torchilin, 2013)

1.4 Protéines impliquées dans la résistance multiple aux médicaments

1.4.1 Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) sont des protéines transmembranaires qui possèdent un rôle inestimable dans la MDR. Ces protéines utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter plusieurs substances (telles que les médicaments, les xénobiotiques, les phospholipides...) à travers la membrane cytoplasmique et à travers la membrane de plusieurs autres compartiments intracellulaires (tels que le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et la mitochondrie) (Štefková, Poledne, & Hubáček, 2004). Cette famille regroupe chez l'humain 48 protéines divisées en 7 sous-familles (ABCA à ABCG). En effet, ces transporteurs possèdent deux sites de liaison nucléotidiques (ATP) et deux

ensembles de six domaines transmembranaires (TM). Les deux sites nucléotidiques appelés « nucléotide binding folds » (NBF) représentent la partie cytosolique de la protéine et possèdent une homologie entre les différentes protéines de la famille ABC (Štefková et al., 2004). Ces transporteurs pompent leurs substrats à l'extérieur du cytoplasme généralement de façon unidirectionnelle à travers la bicouche lipidique. Les gènes codant ces transporteurs sont dispersés dans le génome et leurs séquences d'acides aminés présentent une homologie chez les eucaryotes. Les analyses phylogénétiques montrent que les transporteurs ABC sont divisés en 7 familles dont 6 se retrouvent dans le génome des mammifères et dans le génome de la levure *S. cerevisiae* (Dean, Hamon, & Chimini, 2001). Les trois plus importants transporteurs impliqués dans la MDR sont : la glycoprotéine P, la multidrug drug resistance protein 1 (MRP1) et la breast cancer resistance protein (BCRP).

1.4.1.1 La glycoprotéine P (Pgp)

Découverte en 1976 par Juliano et Ling, la surexpression de cette protéine dans les cellules d'ovaire de hamster chinois est associée à la diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments anticancéreux. Cette protéine a été nommée la glycoprotéine P à cause de sa capacité à moduler la perméabilité membranaire par rapport à certains nombres d'agents anticancéreux (Juliano, R. L. & Ling, 1976). La Pgp confère aux cellules cancéreuses un phénotype de résistance dit « classique » contre quatre classes de médicaments couramment utilisés : les anthracyclines, les alkaloïdes vinca, les Texanes et les épipodophyllotoxines (Endicott & Ling, 1989; Gottesman & Pastan, 1993). La Pgp est une glycoprotéine membranaire de 1280 acides aminés possédant un poids moléculaire apparent de 170 kDa (Ambudkar et al., 1999). Le gène codant pour cette protéine est nommé MDR1 (ou ABCB1). Localisé sur le chromosome 7q36, ce gène comporte 28 exons est caractérisé par une taille de 1.2 Kb (Bell, Trent, Willard, Riordan, & Ling, 1987). Cette protéine est composée de deux sous-unités homologues comportant chacune six domaines hydrophobes transmembranaires suivis par un domaine cytoplasmique de fixation de l'ATP (NBD). Les domaines N- et C- terminaux sont cytosoliques. La Pgp contient trois sites de glycosylations sur le premier domaine extracytoplasmique (Chen, C. et al., 1986). Il existe trois isoformes connues de la Pgp qui sont classe I, II et III. Les trois isoformes de la Pgp existent chez les rongeurs alors que les cellules humaines expriment uniquement les classes I et II (Lee, Bradley, Zhang, & Ling, 1993). Il est

important de noter que la localisation de la Pgp n'est pas limitée aux cellules cancéreuses résistantes. En effet, la Pgp est exprimée par plusieurs tissus normaux. Chez les mammifères, la classe I de la Pgp est exprimée par les cellules épithéliales de l'intestin, les cellules endothéliales, les cellules souches lymphoïdes de la moelle osseuse hématopoïétique, les cellules tueuses naturelles et plusieurs autres types cellulaires. La Pgp classe III est localisée sur les hépatocytes, les cardiocytes et les cellules musculaires striées (Krishna & Mayer, 2000). Cette large distribution de la Pgp à travers plusieurs tissus démontre l'importance de cette protéine dans le bon fonctionnement physiologique de l'organisme. La Pgp participe notamment dans la sécrétion transépithéliale du cholestérol, des phospholipides et de plusieurs autres composés dans la bile, l'urine ou la lumière du tractus gastro-intestinal. De même, la Pgp possède un rôle protecteur en expulsant les xénobiotiques de plusieurs organes tels que le cerveau, les testicules et le placenta. De plus, la Pgp est exprimée par les cellules souches CD34+ de la moelle osseuse et par les cellules B, les cellules T et les macrophages. Le rôle physiologique de la Pgp sur ces cellules n'est pas bien établi. Cependant, certains chercheurs suggèrent que la Pgp est impliquée dans l'excrétion de certaines cytokines endogènes dépourvues de signal de sécrétion (Raghu, Park, Roninson, & Mechettner, 1996). En effet, la manipulation de la Pgp pourrait influencer la réponse immunitaire (Frank et al., 2001).

Le mécanisme d'action de la glycoprotéine P a été défini suite à des études de transfection par le gène MDR1 (Shapiro & Ling, 1995). Les substrats hydrophobes neutres ou chargés positivement sont présentés à partir de la bicoche lipidique directement au transporteur (Ambudkar et al., 1999). Les substrats se fixent sur les régions transmembranaires de la Pgp provoquant ainsi l'exposition des sites de liaison nucléotidiques. Deux molécules d'ATP sont hydrolysées pour pomper une molécule de médicament à l'extérieur de la cellule (Senior & Bhagat, 1998). En effet, une molécule d'ATP se fixe sur un des deux domaines exposés causant un changement de conformation des domaines transmembranaires de la Pgp et l'ouverture du pore pour expulser le substrat à l'extérieur de la cellule (Ramachandra et al., 1998). Une autre molécule d'ATP est nécessaire pour que le transporteur revienne à son état initial de manière à lier un nouveau substrat et terminant ainsi un cycle catalytique (Sauna & Ambudkar, 2000). Les substrats de la Pgp sont largement variés. Malgré leurs différences structurales, les substrats de la Pgp partagent plusieurs propriétés physiques tels l'hydrophobicité élevée, le caractère amphiphile et la nette charge positive (Frezard, Pereira-Maia, Quidu, Priebe, & Garnier-Suillerot, 2001).

Étant donné que la Pgp est surexprimée par plus que 50 % des cancers du sein , elle a été considérée, pendant longtemps comme la seule protéine responsable de la MDR dans les cellules cancéreuses (Klappe, Hinrichs, Kroesen, Sietsma, & Kok, 2004).

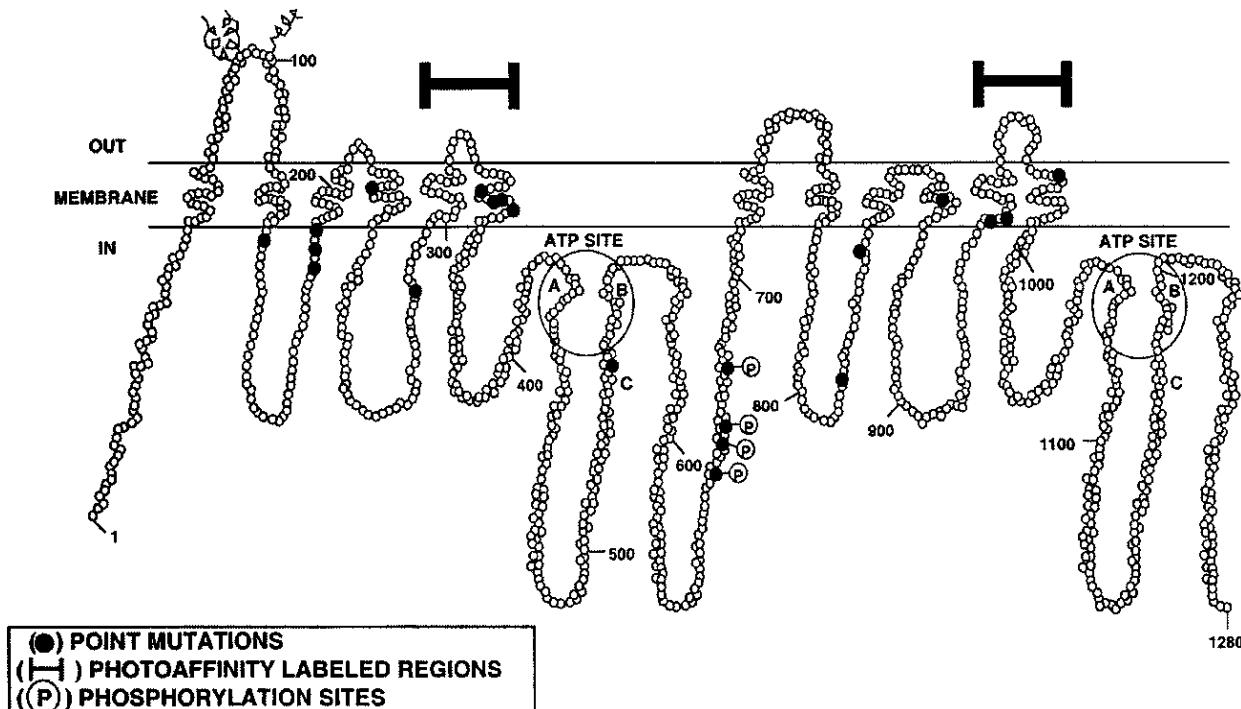


Figure 1-4: Structure de la glycoprotéine P humaine (Ambudkar et al., 1999).

1.4.1.2 La Multidrug Resistance Protéine 1 (MRP1)

Les études sur la MDR dans les années 1980 ont été focalisées en grande partie sur la glycoprotéine P en examinant plusieurs lignées cellulaires et tissus cancéreux. En 1992, des travaux sur des cellules cancéreuses pulmonaires résistantes à la DOX et déficientes en Pgp ont montré une surexpression d'un nouveau gène nommé MRP1 (MDR related protein ou ABCC1). Les études ultérieures ont prouvé que la protéine exprimée par ce gène appartient également à la famille des transporteurs ABC (Leonard, Fojo, & Bates, 2003). La MRP1 possède une taille de 190 kDa et sa séquence peptidique est constituée de 1531 acides aminés. La MRP1 est caractérisée par une structure semblable aux protéines appartenant à la famille des transporteurs ABC. En effet, la MRP1 possède trois domaines transmembranaires et deux sites de fixation de l'ATP (NBD) et une partie N-terminale extracellulaire. À ce jour, plusieurs isoformes de MRP1 ont été identifiées. Autre que les cellules cancéreuses, la MRP est également exprimée par

certains tissus sains de l'organisme. La MRP1 est considérée comme la protéine responsable de la résistance clinique contre certains médicaments (Ozben, 2006). Elle est capable d'expulser les agents anticancéreux à l'extérieur des cellules cancéreuses réduisant ainsi leur accumulation intracellulaire. Contrairement à la Pgp qui transporte des molécules neutres et chargées positivement, la surexpression de la MRP1 est associée à une augmentation du transport ATP-dépendant des médicaments conjugués par le glutathion-S-transférase. Les médicaments anticancéreux impliqués dans le transport par la MRP1 sont principalement la Doxorubicine et la daunorubicine, les vinca-alkaloids et l'étoposide (Manciu, Chang, Riordan, & Ruysschaert, 2000).

1.4.1.3 La Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)

La BCRP est le dernier transporteur ABC qui a été caractérisé. En 1990, chen et al ont réussi à développer une ligné cellulaire d'un cancer de sein (MCF-7 AdrVp) capable de croitre en présence de la Doxorubicine et un inhibiteur de la Pgp et MRP1 (Verapamil). Huit ans plus tard, Ross et Doyle ont réussi à cloner à partir de cette lignée le gène codant pour une protéine appartenant à la famille des ABC appelée Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) (Doyle et al., 1998). Ce gène de 66 Kb est localisé sur le chromosome 4q22. L'ARNm de ce gène de 2.4 Kb est traduit en une protéine (BCRP) de 72 kDa possédant une séquence peptidique de 655 acides aminés. De plus, ce transporteur possède six domaines transmembranaires et un seul site de fixation nucléotidique dans le coté N-terminal contrairement à la Pgp et la MRP1. Étant donné que la BCRP est un semi-transporteur, des homos- ou des hétérodimères seront formés pour assurer l'efflux des composés anticancéreux (Bhatia, Schäfer, & Hrycyna, 2005). Les agents anticancéreux substrats de la BCRP sont les mitoxantane, methotrexate, topotecan, irinotecan et des inhibiteurs de la tyrosine kinase comme imatinib et gefitinib (Ni, Bikadi, Rosenberg, & Mao, 2010).

1.4.1.4 Les modulateurs chimiques des protéines à efflux (Pgp)

La MDR présente un obstacle majeur dans la chimiothérapie à cause de la diminution de l'efficacité des agents anticancéreux. Une augmentation de la dose administrée chez les patients est alors nécessaire afin d'assurer l'effet thérapeutique de ces médicaments. Cependant, la forte dose des médicaments affecte le tissu sain environnant et induit des effets secondaires graves. Ainsi, des inhibiteurs chimiques ont été développés dans le but d'interférer avec les protéines de

transport et inhiber l'efflux des agents chimiothérapeutiques à l'extérieur des cellules cancéreuses. Cette stratégie va assurer un effet thérapeutique en limitant la dose administrée ce qui entraînerait par la suite une réduction des effets indésirables. Ces inhibiteurs sont divisés en trois générations dépendamment de leurs affinités et spécificités à la protéine (McDevitt & Callaghan, 2007). La **première génération** comporte des inhibiteurs des canaux calciques (par exemple Verapamil) et des immunosuppresseurs (comme la Cyclosporine A). Des études ont montré que ces agents altèrent la perméabilité de la membrane plasmique ce qui va diminuer l'efflux des agents chimiothérapeutiques et moduler la MDR (Dolderer et al., 2000; LO, LIU, YANG, & CHERNG, 2001; Schuldes et al., 2001). À des doses optimales nécessaires à l'inhibition de l'activité de la Pgp, cette génération présente plusieurs limites d'utilisation à cause de leur toxicité accrue. En effet, l'administration de Verapamil est associée à des problèmes cardiovasculaires graves tels que l'hypotension, l'insuffisance cardiaque congestive et l'arythmie cardiaque (Pennock et al., 1991). En outre, la cyclosporine A empêche la fixation du médicament anti cancéreux sur la Pgp ce qui inhibe son expulsion à l'extérieur de la cellule cancéreuse (Foxwell, Mackie, Ling, & Ryffel, 1989). Cependant, l'utilisation de cet immunosuppresseur durant des études cliniques a entraîné une myélosuppression importante associée à des infections bactériologiques et fongiques (Dahl et al., 2000). La **deuxième génération** des inhibiteurs chimiques possède une plus grande spécificité et affinité à la Pgp. Cette génération regroupe des analogues de Verapamil comme dexiniguldipine et Valspodar (PSC 833). Ce dernier est un dérivé de la cyclosporine dépourvue des propriétés immunosuppressives et son activité inhibitrice, il est dix fois plus performant que son analogue la cyclosporine (Boesch et al., 1991). Cependant, les inhibiteurs qui appartiennent à la deuxième génération sont des substrats du cytochrome P450 et altèrent son activité enzymatique qui est nécessaire pour le métabolisme des xénobiotiques, en particulier les médicaments. Ainsi, cette interaction entraîne une altération pharmacocinétique des agents anticancéreux et une toxicité durant les études cliniques (Abbasi, M., Lavasanifar, & Uludağ, 2011). Les inhibiteurs de **troisième génération** sont plus sélectifs, ayant une toxicité limitée et des faibles interactions pharmacocinétiques. Parmi les composés de la troisième génération on trouve tariquidar (XR9576) qui est un dérivé d'anthralinamide, elacridar (XR9051) un dérivé de dicétopipérazine et cyclopropyldibenzo-suberane zosuquidar (LY335979). À des doses élevées, ces composés inhibent non seulement la Pgp, mais ils interagissent non spécifiquement avec la BCRP. Cette

interaction non spécifique peut entraîner des effets toxiques vu le rôle détoxifiant de la BCRP dans l'organisme (McDevitt & Callaghan, 2007). Mis à part les inhibiteurs chimiques, l'augmentation de l'ubiquitination de la Pgp entraîne sa dégradation et l'accumulation des médicaments anticancéreux dans la cellule cancéreuse. Zhang et al ont transfecté avec l'ubiquitine des cellules cancéreuses surexprimant MDR1 afin de favoriser la voie ubiquitine-protéasome essentielle à la dégradation de la Pgp et contourner la MDR (Zhang, Wu, Hait, & Yang, 2004). Entre autres, la Pgp est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC). Ainsi, l'inhibition de cette dernière réduit la phosphorylation de la Pgp ce qui va augmenter l'accumulation du médicament anticancéreux dans la cellule. Les études ont démontré que les inhibiteurs de la PKC peuvent aussi interagir directement avec la Pgp inhibant ainsi l'expulsion de médicament anticancéreux par un mécanisme indépendant de la phosphorylation de la PKC (Conseil et al., 2001).

1.5 La thérapie génique et la MDR

Les inhibiteurs chimiques ont été développés dans le but de contourner la MDR en inhibant l'activité effluente de la Pgp et favoriser l'accumulation des agents anticancéreux dans les cellules tumorales. Cependant, ces modulateurs ont montré une efficacité restreinte durant les études cliniques. Ceci est dû à leurs effets non spécifiques et leur toxicité. Par conséquent, il est important d'élaborer des méthodes alternatives qui seront moins toxiques et plus efficaces afin de contourner la MDR. L'une des approches innovatrices pour surmonter la MDR causées par la Pgp est de cibler sélectivement le gène responsable de son expression (MDR1). Cette approche vise à bloquer la traduction de l'ARN messager (ARNm) et empêcher ainsi la synthèse de la Pgp en utilisant différentes stratégies de la thérapie génique (Lage, 2005a). En effet, plusieurs méthodes de la thérapie génique comme les ribozymes et les oligonucléotides anti-sens ont été testées pour réduire le niveau d'expression du gène MDR1. Néanmoins, ces approches présentent une efficacité limitée dans certaines études cliniques (Nagata et al., 2002; Ramachandran & Wellham, 2003). La technologie des « ARN interférents » est une stratégie plus spécifique et efficace pour inhiber l'expression d'un gène. Cette approche a été utilisée dans le cadre de ce projet afin contourner la MDR de façon plus ciblée tout en réduisant les effets non désirables (Lage, 2005a).

1.6 Les ARN interférents

1.6.1 Histoire

Identifiés chez les plantes en 1990, les ARN interférents ont été caractérisés initialement par Richard Jorgensen. Dans le but d'augmenter la pigmentation des fleurs *Pétunia*, ce chercheur à essayer d'insérer dans ces fleurs un transgène de CHS (chalcone synthase) qui est une enzyme clé de la biosynthèse des pigments. Les résultats de cette étude sont inattendus, car la pigmentation a été altérée dans la majorité des plantes transgéniques. Ainsi, lors des analyses des résultats, ce chercheur a introduit le terme de « co-suppression » qui décrit la diminution de l'expression d'un gène suite à l'introduction de son transgène homologue (Jorgensen, Cluster, English, Que, & Napoli, 1996).

Cinq ans plus tard, un groupe de l'université de Washington et de l'université de Massachussetts a essayé un mélange de plusieurs ARN doubles brins sens et anti-sens pour inhiber la fonction de plusieurs protéines chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Les résultats de cette étude étaient aussi inattendus et montrent que l'inhibition des gènes est plus efficace avec les ARN doubles brins qu'avec les ARN simples brins anti-sens. En effet, les chercheurs suggèrent que les ARN doubles brins sont responsables d'interactions stœchiométriques avec l'ARNm du gène cible et entraîne l'inhibition spécifique des protéines (Fire et al., 1998). Ce mécanisme fut appelé « ARN interférence » et honoré en 2006 par le prix Nobel de médecine

L'existence de l'ARN interférence chez les mammifères était le sujet de plusieurs controverses puisque l'introduction des longs ARN doubles brins (ARNdb) chez ces cellules déclenche une réaction antivirale due à l'activation de la voie d'interféron et abouti à la mort de la cellule infectée. En outre, les ARN doubles brins entraînent une activation d'une protéine kinase dépendante de l'ARN (PKR) qui cause une dégradation non spécifique de l'ARN et une répression généralisée de l'expression protéique chez les cellules de mammifères (Waechter et al., 1997).

En 2001, les travaux d'Elbashir montrent que le mécanisme d'interférence d'ARN existe chez les mammifères. En effet, l'introduction des petits ARN interférents (21 nucléotides) dans les cellules de mammifères diminue spécifiquement l'expression d'un gène sans déclencher une réponse inflammatoire (Elbashir et al., 2001).

Les études géniques et biochimiques ont confirmé que le phénomène d'ARN interférents existe chez la plupart des organismes eucaryotes. Les chercheurs pensent que ce phénomène possède un rôle protecteur chez l'organisme. Ce mécanisme est considéré comme un système de défense contre les virus et l'action des transposons qui se déplacent et s'insèrent aléatoirement dans le génome causant l'altération des produits de certains gènes (Gitlin & Andino, 2003; Waterhouse, Wang, & Finnegan, 2001).

1.6.2 Mécanisme d'action des ARN interférents

Les études sur certaines plantes ont montré que l'exposition aux ARNdb d'origine virale entraîne une déplétion des ARN messagers (ARNm) homologues sans affecter le taux de transcription (Jones, L., Ratcliff, & Baulcombe, 2001). Cette corrélation entre la dégradation de l'ARNm et la présence des ARN doubles brins (ARNdb) démontre que ces derniers sont capables de déclencher une cascade d'événements responsables de cette dégradation. Il existe plusieurs types de molécules d'ARN qui peuvent déclencher le mécanisme d'ARN interférent tel que les ARNdb qui proviennent de certains éléments transposables et des virus. Ainsi, les virus à ARN peuvent induire l'ARN interférence par deux mécanismes : l'ARN viral peut agir comme un déclencheur et activer les voies impliquées dans le silençage génique ou les virus codent pour des micro-ARN (miARN, courtes séquences d'ARN simple brin capable d'inhiber l'expression d'un gène) qui seront utilisés par la machinerie cellulaire de l'ARN interférence de la cellule hôte (Waterhouse, Graham, & Wang, 1998). En outre, le mécanisme d'ARN interférence est aussi déclenché par des ARN doubles brins (ARNdb) introduit soit par voie exogène (comme les petits ARN interférents (siRNA), petit ARN double brin capable d'induire une dégradation spécifique d'un ARNm cible) ou codée par le génome produisant des ARN non codants endogènes comme les micros-ARN.

1.6.2.1 Les siRNA (*small interfering RNA*)

L'ARN interférence est initié généralement par des molécules d'ARN double brin. Durant cette **étape d'initiation**, ces molécules d'ARN généralement d'une longueur de quelques centaines de paires de base seront clivés pour générer des petits fragments d'ARN de 21-23 nucléotides connus sous le nom de petits ARN interférents (siRNA). Le clivage est effectué par une enzyme appartenant à la famille des ribonucléases de type III spécifiques aux ARN doubles

brins. Cette enzyme hautement conservée durant l'évolution s'appelle **Dicer** nécessite des cations Mg²⁺ pour stabiliser la dimérisation du complexe dicer/ARNdb (Tuschl & Borkhardt, 2002). Le clivage s'effectue de manière ATP dépendante et préférentiellement à l'extrémité la moins stable de l'ARN double brin. Ce processus génère des siRNA qui contiennent généralement un débordement de deux nucléotides à l'extrémité 3' et un groupement phosphate à l'extrémité 5' qui joue un rôle dans la dégradation de l'ARNm (Hannon & Rossi, 2004; Nykänen, Haley, & Zamore, 2001). Les deux brins des siRNA possèdent une configuration sens et anti sens par rapport à l'ARNm cible. Le brin anti-sens est également connu comme le brin guide, et sert comme une matrice pour le silençage spécifique du gène par la machinerie d'ARN interférence alors que le brin sens est considéré comme un brin passager. Autre que les ARN doubles brins linéaires, Dicer possède comme substrat des ARN en structure d'épingle à cheveux (Carmell & Hannon, 2004). Ainsi, des vecteurs exprimant des petits ARN en structure d'épingle à cheveux (shRNA) sont couramment utilisés pour induire l'ARN interférence. Les siRNA qui sont les produits de Dicer peuvent aussi être introduits dans les cellules par voie exogène via plusieurs méthodes de transfection afin d'initier l'ARN interférent (Hannon & Rossi, 2004).

Pendant **la phase effectrice**, les siRNA interagissent avec un complexe protéique appelée RISC (*RNA induced silencing complex*). L'activité ARN hélicase de ce complexe aboutit à la dissociation des deux brins des siRNA. La dissociation des deux brins des siRNA est ATP dépendante et entraîne l'activation du RISC. Seul le brin anti-sens est conservé au sein du complexe RISC alors que le brin sens sera dégradé pour faciliter la formation du RISC (Matranga, Tomari, Shin, Bartel, & Zamore, 2005; Rand, Petersen, Du, & Wang, 2005). RISC est constitué aussi d'une protéine de la famille Argonaute (Ago) qui est responsable de son activité endoribonucléasique. De plus, Ago semble intervenir dans l'incorporation des siRNA dans RISC (Hammond, Boettcher, Caudy, Kobayashi, & Hannon, 2001). Le brin guide incorporé dans RISC fixe l'ARNm cible par complémentarité de base. En effet, l'extrémité 5' phosphate du brin sens est essentielle pour la dégradation de l'ARNm cible (Nykänen et al., 2001). La fixation de l'ARNm par RISC induit le clivage de ce dernier au centre du duplex formé avec le brin guide siRNA et la région complémentaire de l'ARNm cible. Le clivage s'effectue entre les nucléotides 10 et 11 en amont de l'extrémité 5' du brin guide ce qui aboutit à la dégradation de l'ARNm et le silençage génique (Rana, 2007).

L'ARN interférent est caractérisé par une efficacité due à une étape **d'amplification**. Les siRNA issus de la dégradation des ARNdb par Dicer peuvent amplifier le silençage génique. En effet, le brin de siRNA fixe la séquence cible de l'ARNm et peut servir comme une amorce pour un ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRP). Cet enzyme peut convertir la région cible de l'ARNm en ARNdb qui sera ensuite dégradé par Dicer en siRNA aboutissant à une « réaction de dégradation en chaîne par polymérase » et l'altération de l'ARNm cible restant (Nishikura, 2001; Sijen et al., 2001). Ce modèle a été découvert chez les plantes, les champignons et les nématodes (Cogoni & Macino, 1999; Sijen et al., 2001) ce qui explique la transmission de silençage par l'ARN interférence à plusieurs générations chez *C.elegans* (Fire et al., 1998). Par contre, les études de séquençage n'ont identifié aucun homologue de RdRP chez les mammifères. En effet, les chercheurs suggèrent l'existence d'autres enzymes capables d'amplifier l'ARN interférence chez ces organismes.

1.6.2.2 Les micro-ARN (miARN)

Tel que mentionné ci-dessus, le silençage génique par la machinerie de l'ARN interférence peut être effectué par une voie endogène via des petits ARN non codants (ou miARN). Les miARN possèdent un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de certains gènes impliqués dans plusieurs fonctions biologiques chez la plupart des organismes pluricellulaires (Bartel, 2004; Wienholds & Plasterk, 2005). La liaison de RISC avec le miARN abouti à la formation d'un complexe appelé miRISC. Le mécanisme d'ARN interférence souvent associé aux siRNA est également initié par les miARN. La biosynthèse de ces miARN débute dans le noyau à partir des gènes qui sont insérés avec une orientation sens et anti-sens dans des régions intergéniques ou des unités de transcription (Lagos-Quintana, Rauhut, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Mourelatos et al., 2002). Les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II en miARN primaires (pri-miARN) ayant une coiffe à l'extrémité 5' et une queue polyA. Ces pri-miARN se replient pour adopter une structure tige-boucle (*stem-loop structure*) en suite ces structures seront clivées par Drosha-DGCR8 (*DiGeorge critical region gene 8*) pour former des pré-miRNA d'environ 70 nucléotides. Drosha est une RNase nucléaire de type III qui interagit avec le cofacteur DGCR8 pour générer des pré-miARN contenant un débordement de deux nucléotides à l'extrémité 3' et un groupement phosphate à l'extrémité 5'. Identifiée récemment par kim et al, DGCR8 connu sous le nom Pacha (partenaire de drosha) est capable de lier et

reconnaître spécifiquement les pri-miRNA (Han et al., 2006). Les pré-miARN ainsi formés sont fixés au complexe d'exportation nucléaire exportin-5-RanGTP qui va assurer leur transport vers le cytoplasme. Durant le transport nucléaire des pré-miARN, le cofacteur Ran fixe le GTP qui sera par la suite hydrolysé dans le cytoplasme en GDP et les pré-miARN seront alors libérés du complexe d'exportation. Les pré-miARN de 70 nucléotides sont ensuite clivés par Dicer à des miARN mature d'environ 22 nucléotides qui seront fixés par RISC aboutissant à la formation du complexe miRISC. Ensuite, le miRISC avec le brin guide de miARN est dirigé vers l'ARNm cible et fixe la région 3' non codante (UTR). La complémentarité entre le miARN et la région cible de l'ARNm est généralement partielle. Cependant, la région qui couvre les bases 2-8 des miARN est caractérisée par une complémentarité de base plus importante, cette région est appelée la région « graine » (Lewis, Shih, Jones-Rhoades, Bartel, & Burge, 2003). En outre, des études récentes ont montré que l'appariement des bases peut également se produire entre la région centrale de miARN et l'ARNm cible (Shin et al., 2010). L'ARNm cible ne sera pas clivé, mais sa traduction sera réprimée. En outre, des chercheurs ont récemment montré que l'appariement du brin guide du miARN à l'ARNm cible entraîne l'acheminement du duplex miARN-ARNm vers le « corps P » où il va y avoir une répression traductionnelle soit par déadenylation de l'ARNm et son décoiffage (Eulalio, Behm-Ansmant, & Izaurralde, 2007; Guo, Ingolia, Weissman, & Bartel, 2010; Piao, Zhang, Wu, & Belasco, 2010; Shin et al., 2010). En effet, la complémentarité totale du miARN et l'ARNm cible entraîne la dégradation de ce dernier alors qu'une complémentarité partielle aboutie plutôt à l'inhibition de la traduction.

La découverte de la voie endogène de l'ARN interférence dont les médiateurs principaux sont les micros ARN (miARN) a poussé les chercheurs d'utiliser des gènes synthétiques qui miment cette voie et déclencher ainsi l'ARN interférence chez les cellules mammifères. Plusieurs stratégies ont été testées dans le but de valider cette hypothèse. En effet, la transcription de ces miARN artificiels ou (des courts ARN en épingle à cheveux ou shRNA) sera effectuée à partir d'un système d'expression tel que des plasmides et des virus. Cette expression est régulée par un promoteur d'ARN polymérase II ou III (Paddison, Caudy, Sachidanandam, & Hannon, 2004). Les shRNA générées possèdent des tailles et des structures diverses ayant une tige d'une longueur de 19 à 29 nucléotides. Les shRNA présentent aussi une similarité avec les miARN produit naturellement. Par ailleurs, les shRNA sont codées par des vecteurs spécifiques dont la livraison au sein de la cellule dépend énormément de la méthode de transfection. L'expression

des shRNA peut être également régulée par un promoteur inducible ou un promoteur constitutif qui assure une transcription continue des shRNA (Paddison et al., 2004) dépendamment de la situation. De plus, des études récentes ont montré que la construction qui code pour shRNA influence ultérieurement sa structure. C'est pour cela, une conception judicieuse de la cassette est nécessaire afin d'assurer la production des shRNA avec la conformation la plus efficace durant le silençage (Silva et al., 2005).

1.6.3 Les défis de la thérapie génique par les ARN interférents

La compréhension des mécanismes de l'ARN interférent et ses différents médiateurs ont facilité l'exploitation de cette voie pour un usage thérapeutique. Plusieurs stratégies ont été développées pour cette raison. Ainsi, des ARN recombinants inhibiteurs ont été mis au point pour mimer soit des miARN primaires (pri-miARN) ou des pré-miARN (tels que les shRNA). Des siRNA synthétisés chimiquement ont aussi été utilisés comme un produit de Dicer dont le but est de déclencher la voie d'ARN interférent. Chaque classe thérapeutique aboutit à un silençage génique en déclenchant des voies de silençage différentes. En effet, la différence majeure entre les siRNA et les courts ARN en épingle à cheveux (shRNA) est la méthode de livraison cellulaire et la durée de silençage génique.

1.6.3.1 Le silençage génique non spécifique et les solutions associées

Malgré l'utilisation des ARN interférents pour réduire spécifiquement l'expression d'un gène, plusieurs études récentes ont montré que le silençage génique par ce processus présente un défaut de spécificité. Notamment, plusieurs facteurs contribuent à un silençage non spécifique ou « off-target effect » chez les mammifères.

La stimulation de la réponse immunitaire innée est un des facteurs qui entraînent un « off-target effect ». La PKR (une protéine kinase dépendante de l'ARN bicaténaire) est une composante de la réponse immunitaire innée antivirale et son activation suite à sa fixation à l'ARN entraîne l'inhibition de la traduction protéique (Lu, Wambach, Katze, & Krug, 1995). L'efficacité de l'activation de la PKR dépend de la longueur de l'ARNdb introduit dans la cellule. En effet, une réduction de cette efficacité d'activation est observée lors de l'utilisation des ARNdb environ 30pb. Cependant, des études récentes ont montré que les siRNA ainsi que les shRNA sont capables de déclencher l'activation de la PKR dans certaines conditions et

dépendamment de la ligné cellulaire ce qui aboutit à une répression généralisée de l'expression protéique (Pebernard & Iggo, 2004; Sledz, Holko, De Veer, Silverman, & Williams, 2003). D'autre part, la structure et la nature chimique des siRNA influencent le type de la réponse antivirale déclenchée. En effet, des siRNA transcrits *in vitro* par une polymérase T7 sont caractérisés par une extrémité 5' triphosphate capable d'induire la production d'interféron de type I (Kim & Rossi, 2007). Cette voie est capable d'activer indirectement la PKR entraînant une dégradation non spécifique de l'ARNm. De même, les siRNA caractérisés par une extrémité franche peuvent mener à l'expression d'un ARN hélicase capable de modifier la structure secondaire des ARN. Cet enzyme connu sous le nom de RIG-I (gène inducible par l'acide rétinoïque 1) possède un rôle important dans la régulation de l'expression génique et la modulation de la réponse immunitaire (Davidson & McCray, 2011).

Nonobstant son rôle dans le silençage non spécifique, la stimulation de la réponse immunitaire peut contribuer à l'amélioration de l'efficacité des siRNA durant le traitement de certaines maladies. Les siRNA réduisant l'expression d'un gène cible possèdent un pouvoir immunostimulant dépendant de la séquence puisqu'ils sont reconnus par les *toll-like receptors* (TLRs) (Robbins, Judge, & MacLachlan, 2009). Notamment, les siRNA sont reconnus par les TLR3 qui sont localisés dans la membrane cellulaire et la membrane de l'endosome. En effet, leur activation inhibe la croissance des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ce qui est avantageux pour prévenir ou traiter la vascularisation de la cornée (Cho et al., 2009). Entre autres, l'activation des TLRs par les siRNA stimule les cellules dendritiques ce qui engendre une réponse immunitaire anti-tumorale. Récemment, des études ont démontré l'efficacité des siRNA à activer à la fois une réponse immunitaire anti-tumorale et diminuer l'expression d'un gène cible (Kortylewski et al., 2009). Ces propriétés des siRNA peuvent susciter l'avènement et le développement des études cliniques pour ouvrir la voie vers une approche thérapeutique innovante jumelant le silençage génique et l'immunothérapie cancéreuse.

Plusieurs stratégies ont été développées pour diminuer l'effet immunostimulant des siRNA dans le but d'élargir leur spectre d'utilisation tout en réduisant leurs effets secondaires. La modification chimique des siRNA aboutit généralement à une diminution considérable de l'activation des TLRs. En effet, l'utilisation des siRNA dont le brin passager contient des purines modifiées avec un groupement 2'-O-méthyl, a démontré une réduction de la production des interférons tout en conservant le pouvoir de silençage spécifique (Judge, Bola, Lee, &

MacLachlan, 2006; Semple et al., 2010). Cette modification a amélioré également la stabilité des siRNA dans le sérum (Czauderna et al., 2003).

Parmi les autres facteurs qui contribuent à un silençage non spécifique est la complémentarité des siRNA avec l'ARNm cible. Les miARN sont capables de reconnaître et moduler l'expression du gène malgré une complémentarité partielle avec leur cible. Ceux-ci soulèvent l'hypothèse que les siRNA sont capables d'inhiber l'expression d'un gène en dépit d'une complémentarité de base imparfaite avec son ARNm. En effet, des études de microarray ont révélé que les siRNA peuvent silençer un gène suite un appariement de 14 bases et même moins entre le siRNA et son ARNm (Jackson et al., 2003). En outre, les travaux de Doechen et sharp ont montré que l'inhibition de la traduction d'un gène par les miARN dépend en grande partie de l'énergie libre qui existe entre les 8 premiers nucléotides de son extrémité 5' et de l'ARNm cible. De même, des études ont confirmé que les miARN sont aussi capables de réprimer la traduction des différents gènes dont les ARNm présentent une complémentarité avec les nucléotides de position 2-7 de l'extrémité 5', connu sous le nom « région graine » (Lim et al., 2005). En se basant sur cette observation, des études récentes montrent aussi que les siRNA sont responsables d'un silençage non spécifique de plusieurs gènes à cause de la complémentarité de la « région graine » du brin guide et l'ARNm de ces gènes (Jackson, Burchard, Schelter, et al., 2006). Ces constatations ont incité les chercheurs à mettre au point des stratégies pour contourner le silençage non spécifique dû à ce défaut de complémentarité. L'incorporation d'un groupement 2'-O-méthyle sur le brin guide des siRNA est l'une des stratégies développées afin de réduire considérablement le silençage non spécifique lié à cet effet (Jackson, Burchard, Leake, et al., 2006).

Ces interprétations issues de ces études permettent une meilleure conception des siRNA. L'analyse des séquences des siRNA et leur structure secondaire ainsi que leur stabilité thermodynamique avec RISC ont contribué au développement de plusieurs algorithmes dédiés à concevoir des siRNA efficaces (Ding, Chan, & Lawrence, 2004; Yiu et al., 2005). Les interprétations qui orchestrent ces algorithmes sont issues des observations empiriques suite à une évaluation systématique de l'efficacité des siRNA. Les siRNA sont choisis à cause de leur similarité avec l'ARNm cible et après un examen de leur complémentarité avec les ARNm de tous les génomes pour éviter tout silençage non spécifique. Il existe plusieurs critères à considérer durant le processus de choix des siRNA. Parmi ces critères on trouve l'asymétrie de la séquence

des siRNA. En effet, plusieurs travaux ont démontré qu'une séquence ayant une structure asymétrique (avec un débordement de deux nucléotides dans les deux extrémités) est plus facilement accessible au RISC et possède un pouvoir de silençage potentiellement plus spécifique et plus efficace qu'une séquence ayant une structure symétrique (Birmingham et al., 2006; Du, Xu, Aronin, & Zamore, 2003). L'asymétrie de la séquence des siRNA ainsi qu'une stabilité thermodynamique moyennement faible à l'extrémité 5' du brin guide sont parmi les règles à considérer par plusieurs algorithmes pour concevoir des siRNA efficaces et spécifiques (Tomari & Zamore, 2005). En outre, le pourcentage de GC dans la séquence des siRNA influence la stabilité de ces derniers et il est considéré aussi comme un critère de sélection par plusieurs algorithmes. En effet, la plupart des études sur l'efficacité des siRNA ont été réalisées avec séquences ayant un pourcentage de GC moyennement faible de 30% à 52%. Les résultats de ces études ont démontré qu'un pourcentage faible de GC peut affecter la stabilité des siRNA et réduire son affinité de liaison à l'ARNm cible. Cependant, une teneur élevée de GC dans la séquence des siRNA peut gêner la liaison avec RISC et diminuer l'efficacité de clivage (Chalk, Wahlestedt, & Sonnhammer, 2004; Reynolds et al., 2004). D'autres paramètres sont aussi pris en considération tels que la longueur de la séquence des siRNA et aussi l'accessibilité du RISC à l'ARNm cible, qui dépend énormément de la structure secondaire de ce dernier (Schubert, Grünweller, Erdmann, & Kurreck, 2005). Le choix d'une séquence efficace de siRNA est une étape cruciale afin d'ouvrir les voies vers des recherches cliniques testant le potentiel thérapeutique du mécanisme de l'ARN interférent chez les humains. Ce choix est effectué en se basant sur les résultats de plusieurs études de dépistages destinées pour cette raison. Suite à ces études, des algorithmes combinant plusieurs règles ont été conçus pour favoriser un choix minutieux des siRNA qui tient en considération les paramètres affectant l'efficacité de silençage.

Il existe deux obstacles majeurs à contourner pour assurer une thérapie efficace par les ARN interférents. Le premier obstacle, dont les solutions ont été abordées précédemment, est le choix des siRNA pour assurer une utilisation exemptée des effets de silençage non spécifiques. Le deuxième obstacle est la livraison des siRNA au niveau du cytosol de la cellule, d'où le développement de plusieurs stratégies.

1.6.3.2 Les obstacles à la livraison des siRNA

1.6.3.2.1 Administration systémique versus administration locale

Les siRNA exercent leur pouvoir thérapeutique dans le cytosol. Les obstacles pour une livraison efficace des siRNA dépendent de l'organe cible et de la voie d'administration. Généralement, une livraison locorégionale présente moins de barrières que l'administration systémique. Une administration locale nécessite des doses faibles et une conception simple pour le transporteur des siRNA (absence de motif de ciblage). Par exemple, l'inhalation intranasale des siRNA (nu ou empaqueté dans des liposomes cationiques) pour traiter le virus respiratoire syncytial a montré une réduction importante de l'infection virale (Whitehead, Langer, & Anderson, 2009) ce qui confirme l'efficacité de cette voie d'administration. Cependant, une administration systémique présente des défis plus importants. Après une injection intraveineuse, les siRNA sont distribués aux organes via la circulation sanguine et subissent en même temps le processus d'élimination. En effet, les siRNA ainsi que leurs transporteurs atteignent rapidement les organes les plus vascularisés (tels que le foie et le pancréas) et peuvent être phagocytés par les monocytes (cellule de Kuppfer et les macrophages) du système Réticuloendothéliale (RES).

1.6.3.2.2 Les barrières extracellulaires et intracellulaires

Indépendamment de la voie d'administration, la destination finale des siRNA reste toujours le cytosol de la cellule cible où ils seront incorporés par RISC et aboutissent à l'inhibition de l'expression génique. Pour atteindre le tissu cible, les siRNA circulants dans le plasma doivent franchir **l'endothélium vasculaire** au niveau des jonctions intercellulaires (extravasation). Dans le tissu normal, le transport des macromolécules (diamètre > 5nm) à travers les barrières microvasculaires est restreint (Juliano, R., Bauman, Kang, & Ming, 2009). Cependant, les macromolécules traversent librement l'endothélium tumoral à cause de sa perméabilité vasculaire importante et son caractère tortueux et dilaté. En outre, la pression créée par l'hyperprolifération des cellules tumorales associées au faible drainage lymphatique favorise le transport des macromolécules ayant un poids moléculaire élevé (supérieur à 40 kDa) et leur accumulation au sein des tumeurs, ce mécanisme est appelé EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). Les siRNA nus ou empaquetés dans un transporteur sont capables de traverser l'endothélium vasculaire et atteindre leur site d'action tumoral par l'effet EPR ce qui permet un ciblage passif des cellules tumorales (Torchilin, 2011).

Toutefois, les cellules sont entourées par un réseau compact qui joue un rôle dans l'adhésion et l'organisation des cellules en tissu. Formé d'un maillage de glycoprotéine

(collagène, Fibronectine, Laminine), de protéine pure (Elastine) et de glycosaminoglycanes (GAG), ce réseau est connu sous le nom de **la matrice extracellulaire** et il représente un obstacle à franchir par les siRNA nus ou son transporteur pour accéder aux cellules cibles. Les complexes formés par les siRNA ou les siRNA nus peuvent fixer de manière spécifique un récepteur de la cellule cible facilitant leur endocytose cellulaire. Après la pénétration dans la cellule, les siRNA doivent quitter les **endolysosomes** (fusion de lysosome avec la vésicule d'endocytose) afin d'éviter leur dégradation (Boussif et al., 1995). Étant donné le pH acide des endolysosomes, l'échappement endosomale est favorisé en utilisant un système de livraison des siRNA dont les paramètres physicochimiques sont sensibles au pH. Cette approche a été largement utilisée pour franchir cette barrière intracellulaire. Enfin, une décomplexation entre le système de livraison et son cargo (siRNA) est nécessaire pour libérer les siRNA dans le cytosol des cellules et déclencher le mécanisme d'ARN interférents (Zeng & Cullen, 2002).

1.7 Les méthodes de livraison des siRNA

Suite à une injection intraveineuse chez les souris, les siRNA nus seront détectés 5 minutes après dans les urines (Van de Water et al., 2006). La demi-vie courte des siRNA nus *in vivo* est due principalement à sa petite taille (<15 kDa) qui favorise leur filtration glomérulaire et l'excrétion rapide dans les urines. De plus, les siRNA nus sont vulnérables à la dégradation par les RNases trouvées dans le sérum avec une demi-vie sérique relativement faible (de 5 à 60 min). En raison de leur poids moléculaire moyennement élevée et leur nature polyanionique (environ 40 charges négatives dues aux phosphates), les siRNA ne peuvent pas franchir librement la membrane cellulaire.

Cependant, la demi-vie des siRNA circulants peut être améliorée et atteindre même des journées complètes. Ceci est suite à une complexation des siRNA avec d'autres molécules ou leur incorporation dans différents types de particules (Schiffelers, R.M. et al., 2004; Soutschek et al., 2004) et aussi en effectuant des modifications chimiques pour augmenter leur résistance à l'action des RNases. Entre autres, à l'égard de leur instabilité, leur vulnérabilité et aussi leur incapacité à franchir la bicoche lipidique, une méthode livraison rigoureuse est alors requise pour assurer l'accessibilité des siRNA aux cellules cibles, ce qui va potentialiser leur effet thérapeutique et réduire efficacement l'expression de l'ARNm cible.

1.7.1 Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont un des piliers de la thérapie génique pendant plus qu'une décennie. Récemment, ces vecteurs ont été utilisés dans le domaine des ARN interférents grâce à leur pouvoir de transfection très élevé et leur capacité d'intégration dans le génome de leur hôte. Les cinq familles des vecteurs viraux actuellement utilisés pour la livraison des siRNA sont les Réovirus , Lentivirus, Adenovirus, virus associés aux adénovirus (AAV) et les Baculovirus (Ong, Li, Du, Tan, & Wang, 2005).

1.7.2 Les vecteurs non viraux

En dépit de leur efficacité de livraison, l'utilisation des vecteurs viraux durant les applications cliniques a été marquée par un déclenchement d'une réponse immunitaire agressive et un changement du profil de l'expression génique à cause d'une intégration aléatoire dans le génome (Li, C. X. et al., 2006). Par conséquent, des systèmes de livraison non viraux ont été développés et leur efficacité a été testée dans des études *in vivo* sur des humains et des primates non humains (Liu, G., Wong-Staal, & Li, 2007).

Lors de la conception d'un système de livraison des siRNA, il est primordial de tenir en compte si la maladie à traiter nécessite une administration systémique ou locale. Parmi les avantages d'une administration locale, le recours à un système de livraison facile à produire et à administrer. De plus, la livraison locale requiert des doses faibles pour assurer un pouvoir thérapeutique réduisant ainsi les effets non spécifiques dus aux fortes doses. Cependant, l'administration systémique est largement utilisée pour traiter des maladies qui nécessitent une injection intraveineuse ou intrapéritonéale (Akhtar, S. & Benter, I. F., 2007).

Il existe plusieurs approches et stratégies en cours d'avènement pour assurer une livraison des siRNA utilisant des vecteurs non viraux. Parmi ces méthodes on cite l'utilisation des siRNA nus non modifiés, les siRNA modifiés chimiquement, les microparticules ou les liposomes encapsulant les siRNA et les polymères cationiques. Un critère majeur à considérer lors de la conception d'un système de livraison est sa biocompatibilité et aussi sa génotcompatibilité (Akhtar, S. & Benter, I., 2007; Hollins, Omidi, Benter, & Akhtar, 2007). En effet, des études utilisant des microarray ont démontré que chaque polymère cationique possède sa propre

« signature génique » et module l'expression de plusieurs gènes ce qui augmentera les effets non spécifiques (Omidi et al., 2003; Omidi, Hollins, Drayton, & Akhtar, 2005).

1.7.2.1 Les modifications chimiques des siRNA

La modification chimique peut être effectuée soit sur la base, le sucre ou le squelette des siRNA afin d'augmenter principalement la résistance aux RNases et améliorer les propriétés pharmacocinétiques des siRNA (Shukla, S., Sumaria, & Pradeepkumar, 2010). En effet, la position 2' du ribose est généralement modifiée au niveau de quelques nucléosides par plusieurs groupements en 2'-déoxyribose ou 2'-O-méthyle ou 2'-fluoro. Par conséquent, la demi-vie des siRNA peut dépasser les minutes et atteindre plusieurs heures. L'augmentation de la demi-vie des siRNA dans le sérum suite à des modifications chimiques peut être associée à une perte légère de leur efficacité (Dykxhoorn, Palliser, & Lieberman, 2006). Étant donné que l'élimination des siRNA par la clairance rénale est plus rapide que leur dégradation par les RNases, donc l'augmentation de la demi-vie des siRNA est assurée suite à leur livraison de manière à échapper à la filtration glomérulaire. Par exemple, la conjugaison des siRNA avec le cholestérol favorise la fixation de l'albumine ce qui contribue à l'échappement à la filtration glomérulaire et à l'augmentation de la demi-vie des siRNA de 6 à 95 minutes *in vivo* (Li, S. & Huang, 2006; Soutschek et al., 2004).

1.7.2.2 Les systèmes cationiques de livraison

Les lipides et les liposomes cationiques, les polymères cationiques, les dendrimères cationiques et les peptides cationiques pénétrant la cellule (CCP) sont utilisés comme des systèmes de livraisons des siRNA (Kawakami & Hashida, 2007). Ces vecteurs partagent la même charge positive ce qui favorise la formation des complexes avec les siRNA polyanioniques via des liaisons électrostatiques et des interactions avec la membrane cellulaire chargée négativement (Kim & Rossi, 2007; Xie, Woodle, & Lu, 2006). Les nanoparticules et les complexes ainsi formés doivent avoir une taille inférieure à 100 nm pour échapper à l'excration rénale et traverser facilement la membrane cellulaire.

1.7.2.2.1 Liposome et Lipoplexes

Les liposomes sont constitués d'un compartiment aqueux, qui contient généralement un médicament hydrophile, emprisonné par des bicouches de phospholipides. La bicouche contient généralement un composé lipidique (un lipide cationique ou fusiogénique), du cholestérol et du polyéthylène glycol-lipide (PEG-Lipide). Les liposomes possèdent des caractères physicochimiques d'une particule stable. En revanche, les lipoplexes sont formés spontanément suite à une interaction électrostatique avec les lipides chargés positivement et le caractère anionique des acides nucléiques. Les particules formées sont instables d'où l'importance de préparer les lipoplexes avant chaque utilisation. (de Fougerolles, 2008). Lipofectin, RNAfect, Oligofectamine, Lipofectamine et TransIT TKO sont des systèmes de livraisons lipidiques commercialisés utilisés *in vitro* pour assurer une livraison efficace des siRNA (de Fougerolles, 2008; Zimmermann et al., 2006). DOTAP (1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propane) et Oligofectamine sont parmi les premières formulations lipidiques utilisées *in vivo* pour la livraison des siRNA, dans le but d'inhiber l'expression du TNF-alpha et bêta-catenin chez les souris (Sørensen, Leirdal, & Sioud, 2003; Verma, U. N., Surabhi, Schmaltieg, Becerra, & Gaynor, 2003). Entre autres, les liposomes cationiques appelés SNALPs (*stable nucleic acid lipid particles*) ont été utilisés avec succès comme un système de livraison des siRNA chez les souris et les primates non humains. En effet, une injection intraveineuse d'une dose de 2.5 mg/kg des SNALP conjugués avec des siRNA-anti ApoB (Apolipoprotéine B) entraîne une diminution remarquable de l'ApoB chez le singe (Zimmermann et al., 2006).

Il est aussi important de noter que la PEGylation améliore les paramètres pharmacocinétiques des liposomes. Les liposomes pégylés représentent des systèmes de livraisons approuvés cliniquement pour la libération du Doxorubicine donc leur utilisation pour livrer des siRNA serait une approche prometteuse et efficace.

1.7.2.2.2 Les polymères cationiques

Les polymères cationiques linéaires et branchés, dont les paramètres physicochimiques sont très bien connus, représentent des systèmes de livraisons efficaces pour les acides nucléiques. En effet, les polymères chargés positivement forment des polyplexes avec les siRNA suite à une interaction électrostatique avec leur groupement phosphate chargé négativement (Gilmore, Fox, Hollins, Sohail, & Akhtar, 2004). Les polyplexes condensent les siRNA tout en

les protégeant contre la dégradation des nucléases. Les paramètres physicochimiques des polyplexes (taille, charge et structure) dépendent du ratio entre la charge positive du polymère et le nombre de groupements phosphate des siRNA. De plus, l'influence de ces paramètres sur l'efficacité de livraison a été étudiée chez plusieurs polymères tels que poly-L-lysine, polyethyleneimine (PEI), poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA), Poly (alkylcyanoacrylate), chitosane et gélatine. Le PEI reste le polymère le plus étudié pour la livraison des acides nucléiques *in vivo* et *in vitro*. Les polymères cationiques possèdent des propriétés uniques connues sous le nom d'éponge à proton (*proton sponge*) à cause de leur densité de charge positive. Cette propriété permet l'échappement endosomale pour prévenir la dégradation des siRNA dans l'endolysosome.

En effet, les polymères cationiques ayant une densité importante de charge positive entraînent un accroissement d'influx de proton et l'augmentation de la pression osmotique ce qui induit un gonflement osmotique puis la rupture des endosomes. Ainsi, les siRNA libérés dans le cytosol déclenchent le mécanisme d'ARN interférents (Pack, Hoffman, Pun, & Stayton, 2005) et l'inhibition de l'expression du gène cible.

Dans le présent travail, le chitosane est le polymère cationique utilisé pour la livraison des siRNA.

1.8 Les ARN interférents et le silençage du gène responsable de la Résistance Multiple aux Drogues (MDR1)

Contrairement aux inhibiteurs chimiques, l'ARN interférent représente une approche plus spécifique et moins毒ique pour réduire l'expression de la Pgp, protéine responsable de la MDR chez les cellules cancéreuses. Les premières études de preuve de concept ont été publiées en 2003 et démontrent que ce mécanisme est capable de contourner la MDR *in vitro* (Nieth, Priebsch, Stege, & Lage, 2003; Wu, H., Hait, W. N., & Yang, J. M., 2003). Durant ces deux études, des siRNA synthétisés chimiquement aboutissent à une diminution transitoire de l'expression de la Pgp.

D'autres molécules ont été utilisées pour une inhibition spécifique de la Pgp telles que les micro-ARN (miARN) (Zhu et al., 2008), les ribozymes en tête de marteau (Nagata et al., 2002) et les oligonucléotides anti-sens (Pakunlu et al., 2006).

Les miARN sont des séquences simples brins de 19-25 nucléotides. Ces séquences sont produites par Dicer à partir des structures d'ARN en épingle à cheveux et inhibent l'expression génique suite à leur fixation sur RISC (Pillai, 2005). L'Oligofectamine complexé avec les miARN (anti-Pgp) induit une réduction de 40% du niveau de l'expression de la Pgp chez les cellules cancéreuses ovariennes résistantes, l'A2780DX5. Cette réduction se manifeste par une inhibition de la croissance cellulaire de 50% par Vinblastine (Zhu et al., 2008).

Les ribozymes en tête de marteau sont des séquences d'ARN ayant une longueur 30-40 nucléotides. Les ribozymes en tête de marteau disposent d'une structure qui contient trois tiges-boucles qui se réunissent en une région centrale non appariée où se trouvent des résidus conservés de site de clivage. Les ribozymes possèdent la propriété de catalyser une réaction chimique spécifique et ils sont capables de contrôler l'expression génique avec une élimination spécifique des ARN (Amarzguioui, M. & Prydz, 1998). Ces entités ont été utilisées pour contourner la chimiorésistance et augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses de colon au Doxorubicine (Nagata et al., 2002). Les oligonucléotides anti-sens sont des séquences complémentaires aux ARNm cibles et recrutent des RNases pour cliver l'ARNm et inhiber sa traduction. Le recours aux oligonucléotides anti-sens, dans les travaux de Motomura et al, induit une diminution de l'expression de 75% de la Pgp chez les cellules K562 (cellules cancéreuses d'une leucémie myéloïde) (Motomura et al., 1998).

1.8.1 Les systèmes utilisés pour la livraison des siRNA anti-Pgp *in vitro*

Plusieurs systèmes de livraisons ont été évalués pour moduler la surexpression de la Pgp *in vitro*. Les systèmes de livraisons lipidiques représentent le choix approprié pour la livraison de siRNA grâce à leur simplicité de synthèse et aussi leur efficacité de transfection. Cependant, l'utilisation de ces transporteurs entraîne plusieurs effets toxiques et l'activation du système immunitaire. Le Lipofectamine 2000 (Li, L., Xu, Min, & Huang, 2006) et l'OligofectamineTM (Nieth et al., 2003; Stierle, Laigle, & Jolles, 2007) sont les systèmes de livraisons lipidiques utilisés avec succès pour diminuer l'expression de la Pgp *in vitro*. Dans certaines études, l'OligofectamineTM a été utilisé pour transporter une seule séquence de siRNA (anti-Pgp) et une combinaison de séquences des siRNA dans les cellules cancéreuses de sein MCF-7. Les résultats ont démontré une diminution de l'expression de la Pgp de 60-80% par ces cellules. Cependant, ces résultats étaient en désaccord avec les prévisions des chercheurs puisque l'efficacité de

silénçage de la Pgp causé par une seule séquence de siRNA est semblable à celles de la combinaison des séquences des siRNA. La concentration des siRNA utilisée dans ces travaux est relativement faible (20nM) (Stierle et al., 2007; Stierlé, Laigle, & Jollès, 2005). De plus, l’Oligofectamine™ a été aussi utilisé comme un système de livraison des siRNA (anti-Pgp) dans les cellules humaines gastriques EPG85-257RDB et pancréatique EPP85-181RDB. La diminution de l’expression de la Pgp varie de 58% à 89% respectivement dans ces deux lignées. Ces travaux ont été marqués par l’absence des tests de toxicité pour évaluer la chimiosensibilisation. (Nieth et al., 2003). En outre, l’efficacité de livraison des siRNA par l’Oligofectamine™ a été une autre fois évaluée dans le modèle résistant (MCF-7/ADR) et le modèle sensible (MCF-7/BC-19) des cellules cancéreuses de sein. Le silénçage de l’expression de la Pgp a dépassé 60% en utilisant une concentration relativement élevée des siRNA (200nM). Cette inhibition se traduit cette fois-ci par une accumulation de Paclitaxel et Doxorubicine dans les cellules cancéreuses résistantes. Plusieurs facteurs influencent un silénçage génique efficace de la Pgp. En effet, la surexpression de cette protéine membranaire requiert des doses importantes des siRNA pour effectuer un silénçage génique. De plus, la Pgp possède une demi-vie longue ce qui exige un silénçage prolongé afin d’effectuer une inhibition continue et efficace de cette protéine. Les résultats ont démontré une baisse de l’expression protéique 24 heures après la transfection par les siRNA et un retour à la normale 72 heures après (Wu, H. et al., 2003). Étant donné que le niveau de la Pgp varie dépendamment de la lignée cellulaire, l’évaluation de l’expression protéique serait alors nécessaire pour de mieux choisir la dose des siRNA.

Les polymères cationiques représentent une méthode alternative aux systèmes de livraison lipidique. Le polyethyleneimine (PEI) est le polymère cationique le plus préconisé grâce à sa forte interaction avec les acides nucléiques (Urban-Klein, Werth, Abuharbeid, Czubayko, & Aigner, 2004). Comparativement aux systèmes de livraisons lipidiques, le PEI offre une meilleure protection des siRNA et une augmentation de leur demi-vie dans le cytoplasme (Akhtar, S. & Benter, I. F., 2007; Dykxhoorn et al., 2006). Cependant, l’utilisation du PEI à haut poids moléculaire est associée à une cytotoxicité déterminée par des altérations morphologiques de la membrane cellulaire aboutissant à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Plusieurs modifications de PEI ont été effectuées pour améliorer son efficacité de livraison (Zintchenko, Philipp, Dehshahri, & Wagner, 2008) comme la fonctionnalisation avec les lipides (Alshamsan et al., 2008). Cependant, le PEI modifié n’a pas été évalué comme un système de livraison des

siRNA anti-Pgp. Entre autres, le PEI est utilisé dans la conception d'un autre type de système de livraison. Ce transporteur est composé du PEI avec un faible poids moléculaire (1.2 kDa) lié à un groupement de polyéthylène glycol (PEG) via un segment lipidique (C18, Oleoyl) (Liu, C. et al., 2009). La stabilité de ce transporteur, son efficacité de livraison et sa toxicité dépendent du ratio entre le PEI et le segment lipidique. Les résultats de cette étude ont démontré une diminution de 70% de l'ARNm codant pour la Pgp en utilisant ce transporteur complexé aux siRNA anti-Pgp (200nM) dans les cellules cancéreuses résistantes, CD133+ issues du cancer du côlon.

1.9 Le chitosane

Découvert en 1859 par Rouget (Badot, Crini, & Guibal, 2009), le chitosane est un produit naturel présent dans la paroi cellulaire et le mycélium de certains microorganismes fongiques tels que *Mucor rouxii* (Bartnicki-Garcia & Nickerson, 1962) et *Rhizopus oryzae* (Hang, 1990). Cependant, la source majeure de chitosane provient de la désacétylation de la chitine, un polymère insoluble formé par des sous-unités de N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type beta-1,4 (Rinaudo, 2006). La chitine est le deuxième biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. L'abondance de la chitine est estimée dans la biosphère à 10 gigatonnes (Maeda, Jayakumar, Nagahama, Furuike, & Tamura, 2008). La chitine est un constituant majoritaire de l'exosquelette des arthropodes (crustacé, insectes) et aussi de la paroi cellulaire de certains champignons, algues et levures (Badot et al., 2009).

La biocompatibilité et la biodégradabilité du chitosane ainsi que ses priorités antimicrobiennes, font en sorte d'accroître les domaines de son utilisation allant de l'agroalimentaire à la médecine (Shahidi, Arachchi, & Jeon, 1999). Dans le domaine médical, le chitosane peut servir comme une peau artificielle, sutures fibreuses absorbables et un accélérateur de cicatrisation. Ce biopolymère est également utilisé comme un matériel physiologique grâce à ses propriétés antitumorales, immunoactivatrices, antimicrobiennes et hypocholestérolomique. Le chitosane est aussi prouvé non toxique et sécuritaire chez les animaux et ainsi que chez les humains. Dans l'organisme, le chitosane est dégradé par les lysozymes en CO₂ et H₂O (Chandy & Sharma, 1990; Fang, Chan, Mao, & Leong, 2001). La charge positive du chitosane lui permet d'interagir avec les composés biologiques chargés négativement (membrane plasmique, lipide, acide nucléique) et lui confère la possibilité d'être un bon candidat dans le domaine de la thérapie génique.

1.9.1 Structure et caractéristique du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide naturel formé d'une distribution aléatoire de deux sous unités, la D-glucosamine (unité désacétylée) liée entre elles et à la N-acétyl-D-glucosamine par des liens glycosidiques de type β (1-4). Le chitosane est produit par désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine. En général, l'isolation de la chitine de l'exosquelette des crustacés est effectuée en trois étapes majeures : la déminéralisation, la séparation de protéine et la dépigmentation (No & Meyers, 1989). Contrairement à la chitine, le chitosane est soluble dans la plupart des solvants organiques tels que l'acide formique, acétique, tartrique, citrique à l'exception de l'acide phosphorique (LeHoux & Grondin, 1993; Peniston & Johnson, 1980). Le chitosane diffère par le degré de désacétylation et le poids moléculaire. Le degré de désacétylation dépend de la concentration alcaline et de la température durant le processus de production de chitosane (Fernandes, Tiera, & Winnik, 2007). La distribution du groupement acétylée (aléatoires ou bloc) sur la longueur de la chaîne de chitosane influence la solubilité du polymère. Cette distribution peut être évaluée en utilisant plusieurs techniques telles que la résonance magnétique nucléaire (H -RMN) (Rinaudo, 2006). La masse moléculaire et sa distribution influencent aussi la solubilité du chitosane et son agrégation dans le milieu réactionnel. Ce biopolymère se comporte comme une base faible (PK_a du groupe amine est de 6,5) insoluble à pH neutre ou alcalin. Il est soluble dans le milieu acide et ses groupements aminés seront chargés positivement. La charge positive du groupement est responsable de son activité biologique et favorise la liaison avec les substances chargées négativement. Sa nature cationique permet une forte interaction électrostatique avec les acides nucléiques (Hejazi & Amiji, 2003). Le chitosane représente alors un très bon candidat dans la thérapie génique. Il peut être utilisé comme un système de livraison des acides nucléiques puisqu'il ne nécessite ni sonication, ni des solvants organiques pour sa préparation ce qui réduit la possibilité d'endommager les acides nucléiques à transporter (Fernandes et al., 2007; Mao, H. Q. et al., 2001).

1.9.2 Le chitosane et la thérapie génique

1.9.2.1 Les caractéristiques du chitosane comme un système de livraison des acides nucléiques

Les formulations du chitosane diffèrent par leurs degrés de déacétylation (DDA), leurs masses moléculaires (MM) et leurs ratios amine : phosphate (N:P). Le degré de déacétylation (DDA) représente la densité de charge positive, la masse moléculaire (MM) représente la longueur du polymère et le ratio N : P représente la quantité de chitosane par rapport aux acides nucléiques. Une combinaison entre ces paramètres affecte l'efficacité de la livraison génique du chitosane.

Il existe plusieurs critères à considérer lors de la conception d'un système de livraison. La simplicité de synthèse, la stabilité dans le sérum, l'internalisation cellulaire, l'échappement endosomal et une toxicité faible sont les éléments majeurs qui influencent le potentiel thérapeutique d'un système de livraison. À la lumière de ces paramètres, le chitosane représente le meilleur choix par rapport aux autres types de systèmes de livraison à cause d'une meilleure flexibilité de ses paramètres physicochimiques et la simplicité de sa production. En effet, le chitosane est caractérisé par une taille facilement ajustable. Plusieurs études ont démontré que la taille optimale des complexes de chitosane pour assurer une meilleure internalisation cellulaire est environ 100 nm. Ce biopolymère entraîne aussi une altération de la membrane cellulaire. En effet, Fang et al. ont étudié l'effet du pH et la masse moléculaire du chitosane sur un modèle expérimental de la membrane cellulaire dipalmitylphosphatidylcholine (DPPC). Le DPPC représente un constituant majeur de la membrane cellulaire. La désintégration de la bicoche de DPPC en présence du chitosane dépend de la masse moléculaire de ce dernier et aussi de son degré de protonation influencé par le pH de milieu réactionnel. Le chitosane est capable alors de diffuser à travers la bicoche lipidique et faciliter la pénétration du complexe chitosane-ADN (Fang et al., 2001). Pour promouvoir son internalisation cellulaire, le chitosane a été conjugué à un ligand spécifique d'endocytose (Vaysse, Burgelin, Merlio, & Arveiler, 2000). Entre autres, l'échappement endosomal est une étape cruciale pour assurer une livraison génique efficace. En effet, le chitosane altère la membrane de l'endosome à cause de sa propriété d'éponge à proton. La diminution du pH à l'intérieur de l'endosome conduit à une protonation des nanocomplexes de chitosane ce qui conduit une diffusion d'eau à l'intérieur de l'endosome avec une

augmentation simultanée de la pression osmotique. Éventuellement, l'accroissement de la pression osmotique induit l'altération de la membrane de l'endosomes et la libération des nanocomplexes de chitosane dans le cytosol (Pack et al., 2005).

La première étude qui a démontré le potentiel du chitosane à livrer l'ADN plasmidique *in vitro*, a été effectuée par Mumper et al. (Mumper, RJ, Wang, J., Claspell, JM, & Rolland, AP, 1995). La taille et la morphologie des nanoparticules formées (la taille moyenne varie de 150 à 600nm) dépendent du ratio N:P et de la masse moléculaire du chitosane. La méthode de préparation, la variation de concentration en sel et le pH du milieu réactionnel influencent aussi la taille des nanoparticules chitosane-DNA et leur potentiel de transfection.

Les nanoparticules du chitosane peuvent être injectées par voie intraveineuse puisque le diamètre le plus petit du capillaire sanguin est de 4 μ m. La taille, la charge de surface et l'hydrophobicité influencent la biodistribution des nanoparticules de chitosane. (Müller, 1991; Tabata & Ikada, 1988). Les particules dont le diamètre est supérieur à 100nm sont rapidement absorbées par le système réticulo-endothélial (RES) du foie, de la rate et des poumons tandis que les nanoparticules du chitosane les plus petites échappent à cette absorption et possèdent un temps de circulation plus prolongée. Généralement, les particules chargées négativement sont éliminées plus rapidement que celles chargées positivement ou neutres (Tabata & Ikada, 1988). De plus, l'opsonine (protéine sérique qui fixe un substrat et promeut son absorption par RES) adhère mieux les surfaces hydrophobes que les surfaces ayant une nature hydrophile. Ainsi, un revêtement hydrophile (comme le polyéthylène glycol (PEG) ou un surfactant non ionique) améliore le temps de circulation (Gref et al., 2002) des particules hydrophobes. Ces résultats démontrent aussi que l'utilisation des nanoparticules avec une surface hydrophile ou une charge neutre serait une approche efficace pour échapper à la phagocytose par RES. En effet, les nanoparticules de chitosane représentent un système de livraison prometteur à cause de ces caractéristiques hydrophiles.

1.9.2.2 Le chitosane comme système de livraison des siRNA

L'influence des paramètres physicochimiques du chitosane sur son efficacité de livraison ne suit pas une règle bien définie. Cependant, diverses études ont testé l'influence de ces paramètres sur l'efficacité de transfection du chitosane complexé aux siRNA.

Howard et al ont étudié *in vitro* et *in vivo*, l'effet du ratio N : P sur la taille et le potentiel zêta des nanocomplexes chitosane-siRNA. Le chitosane utilisé durant ces travaux est caractérisé par une masse moléculaire de 114 kDa, DDA 84% et possède une distribution de taille de 40 à 600 nm. Les résultats de ces travaux démontrent une nette influence du ratio N : P sur la taille des nanocomplexes chitosane-siRNA. De plus, les nanocomplexes chitosane-siRNA sont caractérisés par un potentiel zêta positif supérieur à 18 mV. Les expériences de silençage *in vitro* démontrent une réduction de l'expression de la protéine fluorescente verte (EGFP) de 77.9% chez les cellules H1299. L'étude *in vivo* chez les souris transgéniques EGFP montre que les nanoparticules chitosane-siRNA, administrées par voie nasale, déclenchent le mécanisme de l'ARN interférant au niveau des cellules épithéliales bronchiques entraînant ainsi un silençage génique de 43% par rapport au groupe non traité (Howard et al., 2006). Le travail de Haword et al a été caractérisé par un meilleur silençage génique par rapport aux études précédentes effectuées avec un autre polymère cationique, le polyethyleneimine (PEI) (Urban-Klein et al., 2004).

En 2007, Lui et al, ont eu recours à un autre type de chitosane dont la MM varie de 50 à 1000 kDa et le DDA de 80 à 95%. Les résultats de leurs travaux soulignent une influence de la masse moléculaire (MM) et le DDA sur la taille, la morphologie, le potentiel zêta, la stabilité et aussi l'efficacité de silençage génique des nanoparticules chitosane-siRNA. Les formulations du chitosane caractérisées par une masse moléculaire (MM) et un DDA élevé aboutissent à la formation des nanoparticules chitosane-siRNA plus stables. Néanmoins, les formulations du chitosane caractérisées par une faible MM faible (10 kDa) et un ratio N : P élevé (50) génère des nanoparticules incapables d'induire un silençage génique de la protéine fluorescente (EGFP) chez les cellules H1299. En revanche, le recours aux formulations de chitosane caractérisées par une masse moléculaire MM qui varie de 65 à 170 kDa et un DDA de 80 % aboutit à la formation des nanoparticules chitosane-siRNA dont l'efficacité de silençage génique varie de 45% à 65%. Durant cette étude, le silençage génique le plus élevé est de 80%. Cette valeur est atteinte suite à l'utilisation les nanoparticules chitosane-siRNA issues des formulations caractérisées par un DDA de 84%, un ratio N : P 150 et une masse moléculaire de 114 kDa et de 170 kDa (Liu, X. et al., 2007).

Récemment, Ji et al ont étudié l'effet de la MM et du DDA en utilisant des formulations

de chitosane dont la MM varie de 113 à 140 kDa et le DDA fluctue de 75 à 85 %. Les nanoparticules chitosane-siRNA générées sont distinguées par une structure irrégulière. Ces nanoparticules sont caractérisées par une taille nanométrique (148 nm) et un potentiel zêta positif (58 mV). Les cellules cancéreuses colorectales surexprimant la protéine FHL2 (*Four and a half LIM domains protein 2*) ont été choisies pour évaluer l'efficacité de silençage génique *in vitro*. Les résultats ont démontré une diminution de 70 % du niveau de l'expression de FHL2. De plus, l'analyse de cette protéine par Western blot révèle une diminution significative de son expression. L'inhibition de l'expression de FHL2 suite à la transfection par les nanoparticules chitosane-siRNA entraîne un effet antiprolifératif chez les cellules de cancer colorectal (Ji et al., 2009).

1.9.2.3 Les modifications chimiques du chitosane

Au cours de ces dernières années, plusieurs tentatives de modifications chimiques du chitosane ont été effectuées. Ces études visent à améliorer l'efficacité de chitosane à transporter les siRNA au sein des cellules cibles. La comparaison de l'efficacité de livraison du chitosane modifié par rapport au standard a été réalisée en premier lieu par Katas et Alpar. Ces chercheurs ont eu recours à la gélification ionique du sel de chitosane (chlorhydrate de chitosane et glutamate de chitosane) avec le tripolyphosphate de sodium (STPP) pour former des nanoparticules de chitosane stables caractérisées par une taille de 500 nm. L'efficacité de transfection de ces nanoparticules est nettement supérieure à celle produite à partir du chitosane standard ceux-ci est due à une meilleure fixation des siRNA (Katas & Alpar, 2006). Deux ans plus tard, un autre groupe a étudié la conjugaison du chitosane avec la thiamine pyrophosphate (TPP) (une forme active de vitamine B1). Le TPP, un cofacteur dans le métabolisme des glucides, est plus soluble dans l'eau et moins毒 que le STPP utilisé précédemment. Le groupement amine de TPP, en particulier l'azote de Thiazolium (chargé positivement même au pH physiologique) fixe la charge anionique des siRNA et abouti à la formation des nanoparticules chitosane/TPP-siRNA ayant une taille qui varie de 360 à 600 nm. L'étude de l'efficacité de transfection *in vitro* est réalisée sur les cellules HepG2 qui expriment de façon stable la protéine fluorescente EGFP. Les résultats démontrent que le silençage de EGFP augmente avec la valeur du ratio N : P du chitosane et atteint un maximum de 73% pour un ratio N : P de 80 et une MM 45 kDa (Rojanarata, Opanasopit, Techapornkul, Ngawhirunpat, &

Ruktanonchai, 2008). Entre autres, l'effet de la modification chimique sur la capacité du chitosane à transporter les siRNA est aussi évalué *in vivo*. Pillé et al. ont eu recours, durant leurs travaux, aux siRNA-anti RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) empaquetés dans des nanoparticules de chitosane conjugué au polyisohexylcyanoacrylate (PIHCA). En effet, l'administration intraveineuse d'une dose 1500 µg/kg de ces nanoparticules durant 3 jours inhibent la prolifération des cellules tumorales de 90% chez des souris porteuses d'une xénogreffe de cancer du sein (MDA-MB-231) (Pillé et al., 2006). Préconisé par les résultats de ces études, le chitosane représente un système de livraison prometteur pour transporter les siRNA et assurer leur potentiel thérapeutique *in vivo* dans le cadre des maladies cancéreuses.

CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Depuis la découverte du premier agent anticancéreux, la chimiothérapie demeure le meilleur moyen thérapeutique pour traiter différents types de cancer. Cependant la résistance aux agents anticancéreux présente un obstacle majeur à l'efficacité de la chimiothérapie. Cette résistance est associée à la surexpression de la Pgp, une protéine membranaire responsable l'efflux des drogues à l'extérieur de la cellule cancéreuse aboutissant à la diminution de leurs efficacités. Surexprimée dans plus que 50% de cancer (Klappe et al., 2004), la Pgp représente une cible thérapeutique efficace pour restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses aux drogues (telles que la Doxorubicine). Néanmoins, l'utilisation des inhibiteurs chimiques de la Pgp a été associée à une toxicité accrue (Thomas & Coley, 2003). Une des approches innovatrices est cibler l'ARNm du gène MDR1 par les siRNA pour inhiber la traduction et la synthèse de la Pgp. Cependant, les siRNA sont instables dans le milieu physiologique et incapables de traverser la membrane plasmique à cause de leur charge anionique. Le recours au chitosane comme un système de livraison des siRNA au sein des cellules MCF-7/mdr représente alors l'hypothèse à confirmer dans le cadre de ce projet.

2.1 Hypothèse de recherche

Le chitosane est capable de transporter les MDR1-siRNA de façon efficace afin d'induire un silençage génique optimal et spécifique de la Pgp, protéine membranaire responsable de la chimiorésistance.

2.2 Objectifs

Afin de confirmer l'hypothèse de recherche, les objectifs suivants ont été fixés:

1. Préparer les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA et étudier l'influence des paramètres physicochimiques du chitosane sur la forme, la taille et la charge des nanoparticules formées.
2. Valider le choix de la lignée cellulaire en évaluant l'expression du gène cible (MDR1).
3. Évaluer la capacité des nanoparticules chitosane-siRNA à franchir la membrane cytoplasmique des cellules MCF-7/mdr et à libérer leur cargo dans le cytosol cellulaire.

4. Déterminer la toxicité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA dans les cellules MCF-7/mdr
5. Évaluer la capacité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à inhiber l'expression de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr
6. Confirmer le silençage génique au niveau phénotypique en évaluant le taux de l'expression de la Pgp

2.3 Organisation du projet de recherche

Plusieurs méthodes ont été effectuées dans un ordre chronologique bien précis pour atteindre les objectifs mentionnés précédemment. L'avancement du projet de recherche et les méthodologies adaptées ont été présentés dans la figure suivante:

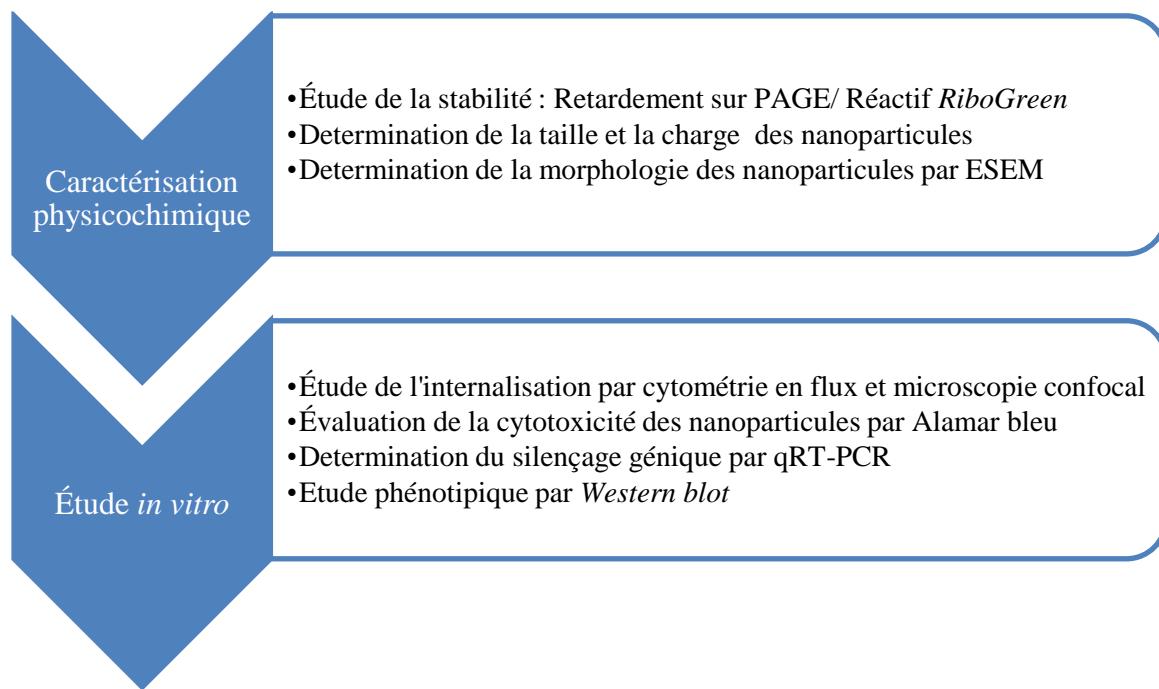


Figure 2-1: Organisation et avancement du projet de recherche.

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

3.1.1 MDR1-siRNA

Les siRNA utilisés dans le cadre de ce travail de maîtrise sont fournis par Dharmacon. Le réactif utilisé est le siGENOME SMART pool destiné à inhiber l'expression du gène MDR1. siGENOME SMART pool représente une combinaison de 4 duplexes siRNA ciblant des régions différentes de l'ARNm (4718 pb) codant pour la Pgp (Figure 4-8). Cette stratégie préconisée par Dharamcon contribue aux maintiens de l'activité inhibitrice des siRNA avec une dilution des effets non spécifiques. Ainsi, l'ensemble des effets non spécifiques de la combinaison des MDR1-siRNA (siGENOME SMART pool) est généralement inférieur à celle associée à chaque duplex qui le constitue (Watts, Deleavy, & Damha, 2008). De plus, le silençage génique par siGENOME SMART pool est garantie d'atteindre 75% de l'inhibition génique. Environ 85% de ces produits sont capables de diminuer de 95 % le taux de l'ARNm cible. Les quatre siRNA constituant le siGENOME SMART pool sont caractérisés par un débordement en 3' de dinucléotide UU et possède aussi un groupement phosphate à l'extrémité 5' (Thermoscientific, 2008). Les siRNA ayant un débordement en 3' sont prouvés non-immunostimulants et échappent à la reconnaissance par le récepteur RIG-I (Marques et al., 2006). En outre, le groupement phosphate à l'extrémité 5' du brin guide favorise l'incorporation dans RISC, une étape clé dans le mécanisme de silençage génique par ARN interférence (Amarzguioui, Mohammed & Prydz, 2004).

Les MDR1-siRNA sont expédiés sous forme lyophilisée, stable au moins quatre semaines à la température ambiante (23 °C) et au moins une année à une température de -20 °C à -80 °C. Suite à la réception du produit, le culot a été resuspendu avec de l'eau certifiée RNase-free à une concentration de 40 µM (ce qui équivaut à 0,532 µg/µl). Les MDR1-siRNA ont été ensuite répartis en petit volume dans plusieurs tubes Eppendorf RNase DNase Free qui doivent être par la suite identifiés et conservés dans une température allant de -20°C à -80°C. Dans ces conditions, les aliquots de MDR1-siRNA sont stables au moins 6 mois. Pour éviter la dégradation par les RNases, la surface (soit du paillage ou celle de la hôte) et aussi tout le matériel utilisé durant les expériences avec les siRNA (pipetman, tubes, portoir...) doivent être pulvérisés par

RNaseZap®. Développé par Ambion®, ce réactif est capable de dégrader les RNases et assurer un environnement RNase Free propice pour les manipulations de toute sorte d'ARN.

3.1.2 Les formulations de chitosane

Le chitosane utilisé dans ce projet a été préparé selon processus de fabrication surveillé par un système de contrôle qualité pour assurer la pureté des échantillons de chitosane produits. Ces derniers doivent être dépourvus des endotoxines bactériennes, des protéines, des métaux toxiques et plusieurs autres impuretés. En effet, les échantillons de chitosane possèdent une teneur d'endotoxine inférieure à 500 EU/g. Le chitosane en vrac possède un DDA qui varie de 98% à 72%. Ces échantillons de chitosane ont été ensuite dépolymérisés par l'acide nitrique. Cette méthode de dépolymérisation de chitosane est largement utilisée grâce à son cout moins onéreux, sa rapidité et sa capacité de contrôler et présélectionner la taille du chitosane généré (Allan & Peyron, 1995). La dépolymérisation des échantillons de chitosane a été commencée par leur dissolution avec 0,5 % (m/v) de l'acide hydrochlorique sous l'effet de l'agitateur magnétique et pendant une nuit complète. Ainsi dessous, les échantillons de chitosane ont été traités par une quantité bien déterminée d'acide nitrique (en raison de 0,001-0,1 mol/mol de glucosamine de chitosane) pendant 16 heures et à une température ambiante. La réaction a été stoppée par précipitation avec 6N d'hydroxyde de sodium ce qui influence le pH de la solution (supérieur à 10). Les échantillons de chitosane ainsi précipités, ont été lavés par des centrifugations inhérentes (4000xg, 2 minutes) suivie d'une dissolution avec de l'eau désionisée jusqu'à l'obtention d'un surnagent ayant un pH neutre. Le chitosane dépolymérisé a été par la suite caractérisé par sa masse moléculaire. En effet, la masse moléculaire moyenne en nombre (**M_n**) et la masse moléculaire moyenne en poids (**M_w**) du chitosane ont été déterminées par chromatographie sur gel perméable (CPG). Les propriétés du chitosane dépendent grandement de ces deux masses moyennes et aussi de l'indice de polydispersité (PDI) qui est le rapport entre M_w et M_n (M_w/M_n). Le PDI reflète la distribution des masses moléculaires des macromolécules dans le polymère. Cet indice représente l'homogénéité du polymère. Plus la distribution de la masse dans le chitosane est étroite, plus la valeur de PDI est faible. Suite à la dépolymérisation du chitosane et la caractérisation de sa masse moléculaire, l'identification du DDA du chitosane représente une étape cruciale dans ce processus d'immatriculation des formulations de chitosane. Le DDA a été déterminé par résonnance magnétique nucléaire H RMN. Cette technique fournit une mesure bien

précise du DDA avec un coefficient de variation inférieur à 0,8%. Plus de détail sur la caractérisation du chitosane a été décrit dans le travail de Lavertu *et al.* (Lavertu, Méthot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006).

Les formulations du chitosane ainsi caractérisées diffèrent alors par leur dégrée de déacétylation (DDA), leurs masses moléculaires (MM) ainsi leurs ratios amine : phosphate (N:P). Le degré de déacétylation (DDA) représente la densité de charge positive, la masse moléculaire (MM) représente la longueur du polymère et le ratio N : P représente la quantité de chitosane par rapport aux siRNA. Pour des fins de simplicité, ces paramètres seront décrits de cette façon soit [DDA-MM-N:P]. Par exemple, la formulation de chitosane 92-10-5 représente une formulation caractérisée par un DDA de 92%, une MM de 10 kDa et un ratio N : P de 5.

Les échantillons de chitosane utilisés dans le cadre de ce projet sont 92-10-5, 92-150-5, 80-10-5 et 82-200-5. Cette dernière formulation ne subit pas la dépolymérisation puisque les échantillons de chitosane livré par la compagnie possèdent une masse moléculaire de 200 kDa. Le terme « chitosane en bloc » a été attribué à cette formulation à cause de cette caractéristique. Les détails associés à ces formulations et les expériences effectuées sont présentés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1: Les caractéristiques associées à chaque formulation de chitosane utilisée pour la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

Chitosane	Expériences	DDA [%]	Mn [kDa]	Mw [kDa]	PDI
92-10	Caractérisation physico-chimique Cytométrie en flux	92,0	8,973	13,674	1,524
	qRT-PCR, Western blot, Alamar bleu	92,7	7,592	11,223	1,478
	Rhodamine-92-10 : Microscopie confocale	92	10,0	14	1,4
80-10	Caractérisation physico-chimique, Cytométrie en flux, Alamar bleu	84,4	10,820	14,525	1,343
	Rhodamine-80-10 : Microscopie confocale	80	12,4	22,4	1,8
92-150	Caractérisation physico-chimique, Cytométrie en flux	191,8	149,700	175,200	1,170
	qRT-PCR, Western blot, Alamar bleu	92,1	137,567	180,667	1,313
	Rhodamine-92-150 : Microscopie confocale	92,7	152	304	2
82-200	Caractérisation physico-chimique, Cytométrie en flux, Alamar bleu	81,1	226,900	392	1,726
	Rhodamine-80-150 : Microscopie confocale	80	143,3	229,28	1,6

3.1.2.1 Préparation du ratio N:P

Tel que décrit précédemment, la masse moléculaire du chitosane et son degré de désacétylation ont été identifiés respectivement par CPG et H RMN. Après leur caractérisation, les échantillons de chitosane se présentent sous forme d'une poudre blanche. Le ratio N : P qui est la quantité de chitosane (groupement amine) par rapport aux acides nucléiques (siRNA) a été préparé comme suit. La poudre blanche de chitosane a été dissoute une nuit à température de la pièce dans l'acide chlorhydrique. La dissolution de chitosane a été effectuée en référant au fichier

Excel conçu par notre groupe. En tenant compte du DDA et la MM du chitosane, ce fichier fournit le volume d'eau et de l'acide chlorhydrique (HCl) requis pour diluer une masse pesée d'une formulation de chitosane donné. La dissolution a été accomplie dans de l'eau *DNase RNase FREE* et exige un ratio 1 : 1 de glucosamine : HCl. Cette étape contribue à la formation d'une solution dite « solution stock de chitosane » ayant une concentration de 5 mg/ml. Cette solution est valable pour un mois. Après la dissolution, la solution de chitosane a été stérilisée, sous la hotte, par un filtre de 0,2 µm pour garantir son utilisation dans les études *in vitro* sans aucun risque de contamination. Ensuite, une étape de dilution de la « solution stock de chitosane » est nécessaire pour obtenir le ratio N : P approprié. La dilution a été effectuée avec de l'eau *DNase RNase FREE* pour garantir son utilisation avec les acides nucléiques. Durant la préparation du ratio N : P, le recours au fichier Excel a été aussi nécessaire afin de choisir le volume exact de l'eau et celui de chitosane pour atteindre la proportion désirée de groupement amine par rapport aux taux de phosphate lors de la formation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. En effet, le calcul avec le fichier Excel tient en considération le DDA du chitosane, sa MM et aussi un autre paramètre qui ne manque pas d'importance qui est la concentration des acides nucléiques avec laquelle les nanoparticules ont été préparées.

3.1.2.2 La formation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées dans un *Eppendorf RNase DNase free* pour éviter les dégradations non désirables des MDR1-siRNA. La préparation des nanoparticules a été effectuée en ajoutant au même volume du MDR1-siRNA un volume égal de ratio N : P approprié (la solution de chitosane diluée telle que décrite dans la section 3.1.2.1). La préparation des nanoparticules doit suivre une certaine concordance dans la succession des étapes. En effet, il est important de mettre en premier lieu le volume de siRNA dans le tube Eppendorf ensuite d'ajouter le même volume de chitosane dilué ayant le ratio N : P désiré pour éviter l'agglomération des nanoparticules. Après, les solutions ont été immédiatement et vigoureusement mélangées par pipetage (environ 20 fois d'up/down) avec la même cadence. Une étape d'incubation à la température de la pièce pendant 30 minutes est requise pour assurer le contact entre les MDR1-siRNA et les chaînes de chitosane afin d'aboutir à la formation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Le volume de la solution des nanoparticules et ainsi la concentration des MDR1-siRNA peut varier dépendamment des exigences de l'expérience.

3.2 Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

3.2.1 Formation et stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

L'analyse de la formation des nanoparticules et l'évaluation de leur stabilité ont été effectuées par deux méthodes distinctes et à plusieurs pH. La première consiste à l'étude de la migration électrophorétique des MDR1-siRNA sur gel de polyacrylamide à 13%. La seconde expérience se base sur la liaison compétitive du réactif *RiboGreen* aux siRNA.

3.2.1.1 Étude de la stabilité des nanoparticules par la technique de retardement sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Les données issues de cette expérience permettent d'évaluer la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à différents pH et durant plusieurs temps d'incubation. L'étude de l'effet de pH sur la stabilité des nanoparticules sera un atout indispensable pour prédire le comportement des nanoparticules dans l'endosome (ayant un pH acide) et dans la circulation sanguine (pH environ 7.4). Le deuxième paramètre à tester révèle l'influence du temps d'incubation sur l'intégrité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Un autre paramètre qui ne manque pas d'importance est l'influence des paramètres physicochimique des formulations de chitosane sur la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide étudie le profil migratoire des MDR1-siRNA et leur « retardement » causé par la complexation au chitosane. Étant donné la taille des siRNA (environ 21 pb), le recours au gel de polyacrylamide représente un choix judicieux. En effet, le gel polyacrylamide offre un pouvoir résolutif de 1 pb (Sanger & Coulson, 1978) et possède ainsi une haute résolution lors de la séparation des petits fragments d'acide nucléique (des siRNA dans notre cas). Les étapes de cette expérience commencent par la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA telle que décrite dans la section 3.1.2.2. La concentration des MDR1-siRNA utilisée durant la préparation des nanoparticules est de 0,1 µg/µl. Resuspendus et dilués dans de l'eau *DNase RNase Free*, les siRNA ont été complexés avec la formulation de chitosane suivante 92-10 à un ratio N : P de 0,5, 2, 5 et 10. Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées en mélangeant 15 µl de siRNA à 0,1 µg/µl avec 15 µl de la formulation de chitosane à étudier. Après une demi-heure (30 minutes)

requise pour la formation des nanoparticules, ces dernières ont été incubées durant 0,5, 4 et 20 heures dans des tampons (avec une concentration de 2X) dont le pH a été ajusté à des valeurs différentes (pH 6,5, 7 et 8). Précisément, la solution des nanoparticules (30µl) a été mélangée avec le même volume du tampon d'incubation dont le pH a été vérifié et ajusté avant chaque expérience. Le mélange suivant un ratio 1:1 entre les nanoparticules et le tampon, a pour but d'avoir une concentration finale de tampon à 1X afin de garder une teneur de sel acceptable et constante tout au long de l'expérience. Pour le pH 6,5 et 7, le tampon utilisé est l'acide 2-(morpholin-4-yl) éthanesulfonique (**MES**) 2X (20 mM MES, 8 mM acétate de sodium, pH 6,5 ou 7) alors que le tris-acétate-acide éthylènediaminetétracétique **TAE** 2X (2M Tris-acétate, 50 mM acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), pH8) a été utilisé pour tester l'effet de pH 8. Après la période d'incubation, une solution de migration (sucrose 6X) a été ajoutée au mélange qui contient les nanoparticules et le tampon d'incubation. Il est impératif d'utiliser de l'eau *DNAse RNAse FREE* durant la préparation du tampon d'incubation et aussi la solution de migration pour diminuer le risque de contamination avec les *RNAases*. Aussi, une stérilisation de ces solutions avec un filtre de 0,2 µm est souhaitable puisque les bactéries représentent une des sources des *RNAases*. La migration a été réalisée sur un gel de polyacrylamide à 13 % (Solution acrylamide/Bis, BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) pendant 120 minutes à un voltage de 100 V. Pour assurer la reproductibilité de l'expérience, la migration a été effectuée dans le même tampon d'incubation et au même pH. Après la migration, les gels ont été émergés dans une solution qui contient 0,5 µg/µl de bromure d'éthidium (BET) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) pour assurer la coloration des siRNA. Le BET fixe ces derniers et devient fluorescent suite à son excitation avec UV. Les gels de polyacrylamide ont été visualisés en utilisant l'appareil Bio-Vision 3000 (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France), tant dis que leur analyse a été réalisée à l'aide du logiciel Vision-Capt (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

3.2.1.2 Étude de la stabilité des nanoparticules en utilisant le réactif *RiboGreen*

La préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été effectuée telle que décrite dans la section 3.1.2.2. La concentration des siRNA utilisée est de 0,025 µg/µl (quatre fois plus petite que celle utilisée dans l'expérience précédente). La dilution de la « solution stock de chitosane » pour obtenir le ratio N:P approprié a été effectuée avec le fichier Excel et en

considérant la concentration des siRNA avec laquelle les nanoparticules ont été préparées. Les nanoparticules ont été préparées en mélangeant 20 µl des siRNA à 0,025 µg/µl avec 20 µl de la formulation de chitosane à étudier (92-10, 92-150, 80-10 et 82-200 avec le ratio N : P de 0,5, 2, 5 et 10). Ensuite, la solution des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA (40 µl) a été incubée avec 40 µl du tampon correspondant et pendant un temps d'incubation bien déterminé (30 minutes, 4 heures et 20 heures). Pour le pH 6,5 et 7, le tampon utilisé est l'acide 2-(morpholin-4-yl) éthanesulfonique (**MES**) 2X (20 mM MES, 8 mM acétate de sodium, pH 6,5 ou 7) alors que le tris-acétate-acide éthylènediaminetétracétique **TAE** 2X (2M Tris-acétate, 50 mM acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), pH8) a été utilisé pour tester l'effet de pH 8. Après l'incubation, une dilution de 1/100 (ex. 5 µl dans 495 µl de tampon) de la solution d'incubation a été effectuée dans le tampon correspondant. Cette dilution permet une quantification en concentration gamme faible (allant de 1 ng/µl jusqu'à 50 ng/µl) (Jones, L. J., Yue, Cheung, & Singer, 1998). Étant donné le recours à une quantification en concentration gamme faible, le *RiboGreen* a été dilué 2000 fois dans du TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) 1X. Il est préférable de protéger la solution du *RiboGreen* pré-dilué de la lumière pour prévenir le photoblanchiment (perte de fluorescence). La mesure de la fluorescence a été réalisée sur une plaque de type *Corning® 96 Well Black Flat Bottom Polystyrene* non stérile et non traitée. L'ajout de 100 µl de la solution des nanoparticules (diluée 100 fois) dans les puits de la plaque a été effectué en premier lieu. Ensuite, un volume de 100 µl de *RiboGreen* pré-dilué a été ajouté dans tous les puits de la plaque. Une période d'incubation de 5 minutes est requise, de préférence à l'abri de la lumière. La mesure de la fluorescence a été réalisée à l'aide du lecteur de microplaques *TECAN Infinite® 200*. La fluorescence a été mesurée en fixant la longueur d'onde d'excitation et d'émission à 485 nm et 535 nm respectivement. Il est aussi important de fixer manuellement un gain à 80 tout au long de l'expérience et durant les différentes lectures du temps d'incubation afin d'assurer la reproductibilité des résultats. Les mesures ont été effectuées en raison de triplicata pour chaque condition testée.

3.2.2 Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

La taille et le potentiel zêta des nanoparticules chitosane-siRNA ont été caractérisés par ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc, UK). L'expérience a été commencée par la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA telle que décrite dans la section 3.1.2.2. La concentration des siRNA utilisée pour la formation des nanoparticules est de 0,1 µg/µl. Les formulations de chitosane suivantes ont été utilisées: 92-150, 92-10, 80-10 et 82-200 avec le ratio N : P 0,5, 2, 5 et 10. Les nanoparticules ont été diluées suivant un ratio 1 :10 (nanoparticules : NaCl) dans du NaCl 10mM. Un volume de 500 µl de la solution de nanoparticules diluées dans du chlorure de sodium (NaCl) a été déposé soigneusement (pour éviter la formation des bulles d'air) dans une cuvette (759075D, Plastibrand®, Brand, Wertheim, Allemagne). La cuvette a été ensuite insérée dans l'appareil. Typiquement, la cuvette possède un petit triangle sur un de ses côtés. Il est primordial de s'assurer que le triangle a été orienté vers l'avant. L'appareil a été programmé de façon à effectuer trois séries de dix mesures afin de déterminer la taille et le PDI des nanoparticules. Pour diminuer les erreurs de mesure liée à la poussière, une filtration des solutions (NaCl et l'eau) est requise en utilisant soit un filtre de 0,22 µm ou 0,45 µm. Ensuite, un volume de 500 µl de NaCl a été ajouté dans la même cuvette. Le volume total a été transféré délicatement, pour prévenir la formation des bulles d'air, dans une cellule capillaire repliée (*Folded Capillary Cell*, DTS1061, Malvern Instrument, Worcestershire, UK) destinée à mesurer le potentiel zêta. La cellule a été ensuite insérée dans l'appareil préalablement programmé pour effectuer trois séries de 15 mesures.

3.2.3 Analyse de la taille et des formes des nanoparticules par microscopie électronique à balayage environnemental

La microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM : *environmental scanning electron microscopy*) permet de visualiser les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA tout en caractérisant leur taille et leur morphologie. Tel que décrit dans la section 3.1.2.2. Les nanoparticules ont été préparées avec une concentration de 0,1 µg/µl. Les formulations de chitosane suivantes ont été utilisées : 91-10-5, 92-150-5, 80-10-5 et 82-200-5. Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées en mélangeant 20 µl de siRNA avec 20 µl de la formulation de chitosane approprié. Une demi-heure après, les nanoparticules ont été pulvérisées

sur un support de silicium. Il est conseillé de laisser le support sécher à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, le support a été pulvérisé avec une couche d'or mince pour augmenter la conductivité de l'échantillon. Afin de diminuer l'interaction non désirable avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA et améliorer la visibilité, la taille de la couche de l'or a été ajustée de 1 à 2 nm par l'instrument Agar Manuel Sputter Coater (Marivac Inc., Lakefield, QC, Canada). Le support de silicium a été ensuite déposé dans la chambre d'observation du microscope électronique à balayage environnemental (ESEM, Quanta 200 FEG, FEI Company Hillsboro, OR, USA). L'observation des échantillons a été réalisée en mode sous vide élevé (High Vacuum). Ce mode a été utilisé pour améliorer la résolution et augmenter le contraste afin de pouvoir visualiser les détails les plus fins des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Durant l'observation en mode sous vide élevé, le voltage a été fixé à 20 KV. La détermination de la taille a été effectuée via le logiciel du microscope XT Docu (XT Docu, FEI Co., Hillsboro, OR, USA). Pour chaque formulation de chitosane, plusieurs images ont été prises afin de confirmer la taille et la morphologie des nanoparticules. En effet, les résultats de l'ESEM supportent les données de la DLS et contribuent à fournir une idée sur la morphologie des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

3.3 Évaluation du potentiel de chitosane comme un système de livraison des siRNA, ciblant le gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr (Étude *in vitro*)

Cette étape permet d'évaluer l'efficacité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA dans les cellules cancéreuses résistantes cultivées sous des conditions bien précises.

3.3.1 Caractéristique de la lignée cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées dans le cadre de ce projet sont les MCF-7 et les MCF-7/mdr. Les deux lignées ont été généreusement fournies par Dr Hamid Morjani. La nomenclature MCF-7 fait référence au Michigan Cancer Foundation-7, l'institut où la lignée a été instaurée pour la première fois en 1973 par Hebert Soule (Soule, Vazquez, Long, Albert, & Brennan, 1973). La lignée cellulaire MCF-7 a été isolée à partir d'un épanchement pleural d'une patiente atteinte d'un cancer de sein métastatique. Cette lignée a été largement utilisée dans les études *in vitro* sur le cancer de sein puisqu'elle conserve les caractéristiques communes d'un épithélium mammaire.

La lignée MCF-7 est capable de fixer l'œstrogène, principalement l'œstradiol, via des récepteurs à œstrogène cytoplasmiques. En plus de la réponse proliférative aux œstrogènes, la lignée cellulaire exprime le cytokératine, une protéine d'origine épithéliale qui favorise l'adhésion de la MCF-7 sur la matrice extracellulaire (Liu, F. et al., 2008). La lignée cellulaire est cultivée sur un support plastique avec une tendance à former des « dômes » de cultures monocouches. La prolifération des cellules est inhibée par le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). En revanche, la croissance des MCF-7 s'accroît en présence des facteurs de croissance analogue à l'insuline (*insulin-like growth factor* IGF-1). En basant sur ces caractéristiques, la lignée cellulaire MCF-7 est le modèle cellulaire adéquat pour les recherches sur le cancer de sein généralement hormonal dépendant. Toutefois, le but de ce travail est d'inhiber l'expression du gène MDR1 responsable de la chimiorésistance chez les cellules de cancer du sein. En effet, des cellules cancéreuses résistantes aux Doxorubicine ont été le modèle de choix dans ce présent travail. Ces cellules ont été isolées à partir des cellules MCF-7 qui sont soumises à une augmentation graduelle de la concentration de la Doxorubicine dans le milieu de culture. La concentration de la Doxorubicine induit des modifications cytogénétiques des MCF-7 contribuant à l'émergence des cellules résistantes. Ces cellules appelées MCF-7/mdr sont 200 fois plus résistantes que la lignée sensible MCF-7. Les MCF-7/mdr sont capables de croître dans une concentration allant jusqu'à 10 μ M de Doxorubicine (Cowan, Batist, Tulpule, Sinha, & Myers, 1986). Parmi les modifications cytogénétiques la plus marquante est la surexpression de la Pgp, protéine cible à inhiber dans le cadre de ce travail. En effet, des études d'hybridation ont démontré que le gène MDR1 codant cette protéine est 60 fois plus amplifié dans les MCF-7/mdr (Fairchild et al., 1987).

3.3.2 Culture et passage cellulaires

Les deux lignées cellulaires sont cultivées dans des flasques en plastique de type *Corning* certifié non pyrogène. Le but de cette étape est de maintenir les lignées cellulaires dans les conditions appropriées afin de préserver leurs caractéristiques et garantir leur utilisation dans les expériences *in vitro*. La lignée MCF-7 sensible est cultivée dans le milieu minimum essentiel de Eagle ou *Eagle's minimal essential medium* (EMEM) qui contient les éléments nutritifs nécessaires à la prolifération cellulaire. Ce milieu de culture a été supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (FBS) et 0,01 mg/ml d'insuline. Ce dernier possède un effet

mitogène sur les cellules MCF-7. Fixant le récepteur d'insuline exprimé à la surface, cette hormone déclenche une cascade de signalisation stimulant la prolifération cellulaire (Miglietta, Panno, Bozzo, Gabriel, & Bocca, 2004). Par ailleurs, les cellules MCF-7/mdr ont été cultivées dans le milieu RMPI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*). De même, 10 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (FBS) est ajouté dans le milieu de culture. Pour maintenir le phénotype de résistance, les cellules MCF-7/mdr ont été cultivées avec une concentration de 500 ng/ml (862nM) de Doxorubicine. Les flasques qui contenaient les cellules avec le milieu de culture approprié, ont été gardés dans incubateur ajusté à 37°C et avec 5% CO₂.

Un passage cellulaire a été effectué généralement lorsque les cellules recouvrent le fond du flasque. Le passage cellulaire est recommandé lorsque la confluence atteint environ 80%. En effet, la confluence signifie l'espace qui existe entre les cellules adhérentes cultivées en monocouche sur le fond du flasque. Il est préférable de ne pas laisser les cellules atteindre une confluence de 100% car à ce stade, dues à l'absence de surface de culture, les cellules commencent à se détacher et mourir.

Un passage cellulaire a été effectué en respectant les étapes suivantes. Le flasque qui contient les cellules et le milieu de culture appauvri a été vidé à l'aide d'une pipette stérile reliée à une pompe à vide. Les cellules ont été lavées avec un tampon phosphate salin appelé PBS (*phosphate buffer salin*). Ensuite, 2ml de trypsine/EDTA ont été ajoutés afin de décoller les cellules du fond de la flasque. Le flasque a été placé pendant 2 minutes dans l'incubateur pour assurer un fonctionnement optimal de l'enzyme. En effet, la trypsine clive les protéines membranaires des cellules adhérentes et les cellules se trouvent alors en suspension. Cette étape est appelée « Trypsinisation ». Cependant, la trypsine peut affecter la viabilité cellulaire d'où l'inhibition de son activité par l'ajout d'un volume de 8 ml du FBS dans le flasque. La teneur élevée des protéines dans le FBS fixe les protéines membranaires des cellules empêchant ainsi l'action de la trypsine. En outre, les études ont montré que le sérum contient un inhibiteur de la sérine protéase appelée α 1-antitrypsin qui fixe la trypsine de façon covalente et induit une inactivation irréversible de l'enzyme *in vitro* (Takahara & Sinohara, 1982). Suite à l'addition du FBS, un mélange par pipetage est nécessaire pour individualiser les cellules et empêcher la formation des agglomérats cellulaires. Un dixième de volume de la suspension cellulaire contenue dans le flasque a été ensuite transféré dans un nouveau flasque stérile qui contient le milieu de culture approprié. Soit EMEM avec 0,01 mg/ml d'insuline pour les MCF-7 sensibles ou

RPMI 1640 avec 500 ng/ml de Doxorubicine pour les MCF-7/mdr. Le flasque a été enfin placé dans l'incubateur pour des utilisations postérieures ou pour un prochain passage cellulaire.

Les expériences *in vitro* requièrent une étape de comptage cellulaire. Cette étape a été effectuée directement par comptage sous microscope à l'aide d'une cellule spécifique appelée « cellule de Malassez ». Après l'ajout du FBS, la suspension cellulaire homogénéisée (environ 10 ml) a été ensuite transférée dans un tube stérile de 15ml. Une étape de centrifugation a été effectuée pendant 5 minutes à 1500 rmp. Après la centrifugation, le culot a été homogénéisé dans un petit volume de milieu de culture restant. Ce dernier a été ajusté dépendamment de la densité du culot cellulaire obtenue. Lorsque la suspension cellulaire est concentrée, il est nécessaire d'homogénéiser dans un volume plus grand de milieux de culture afin de faciliter le comptage. Ensuite, un volume de 25 µl de culot suspendu dans le milieu de culture a été déposé dans un tube Eppendorf avec 75 µl de bleu de trypan. Ce colorant interagit uniquement avec la membrane plasmique intacte des cellules vivantes tant qu'il traverse la membrane cytoplasmique détériorée et aboutie à la coloration des cellules mortes en bleu. Le ratio de dilution 1/4 de la suspension cellulaire avec le bleu de trypan simplifie la procédure du comptage. Ensuite la cellule de comptage a été placée sur une surface plane. Après l'homogénéisation de la suspension cellulaire diluée dans le trypan bleu, un petit volume a été prélevé à l'aide d'une pipette. En plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée sur la lamelle, le volume a été déposé soigneusement et en une seule fois pour remplir la chambre de comptage sans des bulles d'air. Après le remplissage, la cellule a été placée sous le microscope. Le quadrillage a été repéré et le comptage a été effectué en respectant les règles associées au positionnement des cellules par rapport au quadrillage de la cellule de comptage.

3.3.3 Évaluation de l'expression du gène cible (MDR1) dans les cellules MCF-7/mdr

Étant donné que les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA visent à diminuer la surexpression de la Pgp, il est important de vérifier l'existence de ce gène au sein du modèle cellulaire choisi pour les expériences *in vitro*. Pour ce fait, une réaction de polymérase en chaîne (PCR) a été effectuée suite à une réaction de transcription inverse. Quatre couples d'amorces ont été choisis de façon à délimiter la région ciblée par les MDR1-siRNA et augmenter ainsi la probabilité d'amplification de cette région. La conception des amorces a été effectuée en se

référant aux outils bio-informatiques publiées par la base des données de *National Center for Biotechnology information* (NCBI). Ensuite, un blast a été effectué afin de s'assurer que les amores ne pourraient pas amplifier une autre séquence dans le génome. Les amores choisies sont caractérisées par des températures de fusion « Tm » proche. Après l'extraction des ARN totaux (ARNt) avec les colonnes d'affinité (Nucleospin RNA XS) de Macherey-Nagel (BioLynx), la transcription inverse a été réalisée avec le kit QuantiTect® Reverse Transcription (205311, QIAGEN, Toronto, ON, Canada) en suivant les instructions détaillées par le manufacturier. L'ADN complémentaire (ADNc) ainsi obtenu a été amplifié en utilisant l'ADN polymérase (Stratagene) et les quatre couples d'amores. Le milieu réactionnel a été préparé pour avoir un volume total de 50 µl répartis en 1 µl d'amorce sens (20µM), 1 µl d'amorce anti sens (20µM), 1µl de dNTP (10mM), 25µl de tampon de PCR, 19,5 µl de l'eau DNase Free et 2µl d'ADNc. La réaction été programmée comme suit : Une étape d'activation de la Taq polymérase qui dure 5 minutes à 95°C suivies de 45 cycles et enfin une étape d'elongation qui se déroule pendant 5 minutes à 72°C. Les 45 cycles sont répartis en trois phases : une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes suivis d'une phase d'hybridation (60°C pendant 30 secondes) caractérisée par une température supérieure aux Tm des amores (lors des premiers cycles la température se baisse progressivement de 0.5°C chaque 14 cycles) et enfin une phase d'elongation à 72°C pendant 60 secondes. Ce type de PCR appelée PCR par essais (ou PCR *touch-down*) a été choisi afin d'assurer une forte stringence aboutissant à une amplification spécifique de la séquence d'intérêt. Les cycles de la PCR ont été programmés dans le Rotor-GeneTM6000 (Corbett Life Science, NSW, Australie). Après la réaction d'amplification, les échantillons ont été migrés sur un gel de 3% afin de visualiser les amplicons de la PCR. Le gel d'agarose a été ensuite plongé dans une solution contenant 1 µg/µl de bromure d'éthidium et les bandes ont été révélées suite à une exposition au rayon UV en utilisant Bio-Vision 3000 (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Durant la visualisation du gel d'agarose, les bandes des amplicons ont été minutieusement excisées et déposées dans des tubes Eppendorf bien identifiés. Ensuite, une extraction a été effectuée à partir des morceaux d'agarose excisés en suivant les instructions détaillées dans le kit *QIAquick gel extraction* de QIAGEN. Suite à la purification à partir du gel d'agarose, les éluats ont été envoyés au service de séquençage à l'institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC).

3.3.4 Transfection des cellules avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

Les étapes de la transfection ont été établies sur la base des travaux précédents effectués dans notre groupe. Le terme de la transfection est associé aux cellules eucaryotes et il représente l'ensemble des processus qui permettent l'entrée de molécules extracellulaire afin d'exprimer un phénotype désiré.

La transfection a été précédée toujours par une étape d'ensemencement cellulaire. 24 heures avant d'entamer la transfection, un comptage cellulaire a été réalisé tel que décrit dans la section précédente 3.3.2. En se basant sur les résultats de ce comptage, un nombre bien défini des cellules a été déposé dans les puits de la plaque. Le nombre des cellules à ensemencé et ainsi le volume de milieu de culture dans les puits dépend du type des plaques utilisées (500 µl/puits pour une plaque de 24 puits et 100 µl/puits pour une plaque de 96 puits) aussi de la cinétique de croissance cellulaire. Le nombre des cellules à ensemencer a été choisi de façon à obtenir une confluence d'environ 50% le jour de la transfection. Le type des plaques dépend de l'expérience à effectuer. De même, il est fortement recommandé de préparer le milieu de transfection 24 heures avant la transfection. Ce milieu contient de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*) avec une teneur élevée en glucose (12100-046, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le DMEM nécessite le bicarbonate de sodium comme un système tampon d'où l'ajout de 1,85 g de NaHCO₃ pour préparer une litre de milieu de transfection. Pour maintenir la constance de pH, 5 mM de MES a été aussi utilisé durant la préparation de milieu de transfection. Les réactifs ont été dissous dans de l'eau Milli-Q et sous une agitation magnétique. Ensuite le pH du milieu de transfection a été ajusté à 6,5 en utilisant du HCl 1N stérile (H9892, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada). À un pH acide équilibré à 6,5, la couleur de milieu de transfection a été virée vers le jaune. Après l'ajustement du pH, le milieu de transfection a été filtré sous l'hôte, avec un filtre de 0,22 µm adapté à des bouteilles de 1 litre, afin d'éviter le risque de contamination des cellules durant la transfection. Après la filtration, un volume approprié de *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco) a été ajouté de façon à obtenir 10% de FBS dans le milieu de transfection. Deux conditions de transfection ont été évaluées. La première (condition #1) consiste à transfacter avec un milieu de transfection contenant 10% de FBS alors que le FBS est ajouté 5 heures après la transfection durant la deuxième condition (condition #2). Finalement, des aliquots de 15 ml de milieu de transfection ont été conservées dans l'incubateur pendant une

nuit avant la transfection.

Le jour de la transfection, la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été effectuée telle que décrite dans la section 3.1.2.2. Généralement, dans la plupart des expériences, la transfection a été accomplie avec une concentration finale de 100nM par puits. Durant la demi-heure attribuée à la formation des nanoparticules, le pH de milieu de transfection a été vérifié afin de le réajuster à sa valeur initiale (pH=6,5). Il est recommandé de minimiser le contact de milieu de transfection avec l'air ambiant pour réduire la variation brusque et indésirable du pH étant donné que l'efficacité de transfection dépend majoritairement du pH. Ensuite, le milieu de culture couvrant les cellules dans chaque puits, a été aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur stérile reliée à une pompe à vide. Ce milieu a été remplacé par du milieu de transfection mélangé avec le volume approprié des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Le volume de nanoparticules a été issu de l'ensemble des calculs effectué pour transfacter les cellules avec 100 nM de MDR1-siRNA. Il est préférable de bien identifier les puits qui correspondent à chaque condition. Fréquemment, chaque plaque comporte les conditions suivantes : les formulations de chitosane à tester, les cellules non transfectées et les cellules transfectées par du DharmaFECT (T-200-01, Dharmacron). Le DharmaFECT, un lipoplexe produit par Dharamcon, a été utilisé comme un contrôle positif de la transfection. Pour les MCF-7 le type de DharmaFECT recommandé par la compagnie est DharamaFECT 1. Il existe quelque différence dans les procédures de transfections en utilisant cet agent. Les étapes de la transfection sont décrites brièvement. Un volume des siRNA préalablement diluées a été déposé dans un tube Eppendorf *RNase DNase Free*. Pour assurer la reproductibilité de l'expérience, la même concentration des siRNA a été utilisée (100nM). Dans un autre tube, le DharmaFECT a été dilué avec un volume défini du milieu de culture sans sérum. Le contenu du deuxième tube a été mélangé avec le volume des MDR1-siRNA dans le premier tube. Le mélange total a été homogénéisé soigneusement avec quelques cycles d'aspiration-refoulement avec une pipette. Une incubation 20 minutes à température pièce est nécessaire pour la formation des lipoplexes entre le DharmaFECT et les MDR1-siRNA. Ensuite, un volume de milieu de culture sans sérum a été ajouté dans le tube qui contient les lipoplxes afin d'avoir un volume suffisent pour transfacter les cellules avec 100nM des MDR1-siRNA.

3.3.5 Évaluation du trafic intracellulaire des nanoparticules chitosane-siRNA et de la délivrance cytoplasmique des siRNA

La membrane cellulaire représente une des barrières biologiques à franchir par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. L'efficacité des nanoparticules à dépasser cette barrière a été évaluée par cytométrie en flux et par microscopie confocale.

3.3.5.1 Analyse par cytométrie en flux (FACS)

L'analyse par cytométrie en flux représente une approche quantitative pour étudier l'internalisation des nanoparticules par les cellules.

Généralement, la cytométrie en flux permet d'analyser simultanément les caractéristiques des particules isolées (telles que des cellules) qui défilent à grande vitesse par un flux liquide. Les particules entraînées par l'écoulement fluide traversent un faisceau de laser aboutissant ainsi à une caractérisation morphologique et structurale des particules analysées (cellules transfectées dans notre cas). La taille des cellules et aussi leur granulosité intérieure sont parmi les caractéristiques à analyser. Ces paramètres sont déterminés en analysant la lumière incidente diffractée par les cellules et la fluorescence émise par ces dernières.

L'étude de l'internalisation des nanoparticules par cytométrie en flux commence par une étape d'ensemencement cellulaire. Une plaque stérile de 24 trous de type *Corning* a été utilisée comme un support cellulaire. Les cellules MCF-7/mdr ont été ensemencées en raison de 40000 cellules/trou et incubées pendant 24 heures. La transfection cellulaire a été effectuée avec des nanoparticules chitosane-siGLO à pH 6,5 et avec 10% de FBS. Les formulations de chitosane utilisées sont 80-10, 92-10, 92-150 et 80-200 à un ratio N : P 5. La transfection avec le DharmaFECT a été aussi effectuée. La concentration des siGLO avec laquelle les cellules ont été transfectées est de 100nM. Les siGLO sont des ARN doubles brins synthétisés par voie chimique et marqué par 6-FAM. 24 heures après la transfection, les cellules à analyser ont été lavées deux fois avec du PBS. Cependant, l'analyse avec la cytométrie en flux ne permet pas une discrimination entre les nanoparticules internalisées par la cellule et celles qui sont fixées par sur la membrane cellulaire. Ainsi, une étape de trypsinisation a été réalisée afin de réduire l'influence de ces dernières dans les analyses des résultats (Nimesh, Thibault, Lavertu, & Buschmann, 2010). Un volume de 250 µl a été ajouté dans chaque trou de la plaque. Après la trypsinisation, 350 µl de milieu de culture approprié qui contient 10 % de FBS a été déposé pour inactiver la trypsine.

La suspension cellulaire a été ensuite transférée à un tube de 5ml qui a été analysé avec un cytomètre en flux de type BD Canto (Becton Dickinson, San Jose, CA). Avant son utilisation, le cymomètre en flux doit être minutieusement calibré à l'aide des billes fluorescentes afin de créer une zone d'illumination dans laquelle les cellules doivent être précisément entraînées par le centrage hydrodynamique. Pour chaque échantillon, 20000 événements par échantillon ont été analysés. Le cytomètre en flux offre l'avantage de discriminer la sous-population d'intérêt. Donc, un tri des cellules a été réalisé, en discernant une zone d'intérêt des points de la lumière diffracté (FSC) contre la lumière réfléchie (SSC) pour exclure les débris cellulaires, les cellules mortes et les cellules agrégées. Les événements considérés positifs correspondent aux cellules à l'intérieur du « gâte » tracée précédemment. En outre, l'échantillon qui correspond aux cellules non transfectées (cellules seules sans fluorochrome) a été affiché sur un graphique de point (FL1 contre FL2) et la grille de tri a été délimitée de façon à exclure l'auto fluorescence des cellules témoins et analyser uniquement la fluorescence émise par les siGLO. Il est important de noter que chaque condition a été analysée en duplique.

3.3.5.2 Microscopie confocal

La microscopie confocale génère des données qualificatives sur l'internalisation des nanoparticules au sein des cellules. En effet, cette technique fournit des images visualisant les nanoparticules et leur localisation par rapport aux compartiments cellulaires.

Les échantillons à étudier doivent être marqués avec des fluorochromes. Les fluorochromes sont alors excités généralement par un rayon de Laser. Le faisceau de Laser est balayé sur la totalité de l'échantillon à l'aide d'un miroir dichromatique et fixé ensuite dans un plan focal. Le fluorochrome absorbe alors l'énergie du rayonnement excitant et émet une fluorescence. Seule la lumière fluorescente émise du plan de confocale est captée par le « pinhole » et contribue à la formation de l'image. La lumière issue des autres plans adjacents est arrêtée par le bord du trou. La lumière traversant le « pinhole » est captée par un photomultiplicateur et l'image sera reconstituée point par point sur l'écran. En effet, les images ne sont composées que des photons émis par le plan focal d'où leur netteté.

Les formulations de chitosane à tester (92-10-5, 92-150-5 et 80-10-5) ont été marquées par rhodamine B isothiocynate (RITC). La stratégie de marquage du chitosane avec RITC a été élaborée dans notre laboratoire. Cette méthode de marquage n'affecte pas les propriétés physicochimiques et aboutit à un degré de liaison entre le fluorescent (RITC) et le chitosane

suffisamment stable pour effectuer des études rigoureuses d'internalisation.

Le chitosane marqué avec la rhodamine a été utilisé pour complexer des siGLOTM. Ce réactif est développé par dharmacron comme un indicateur de la transfection et l'évaluation de l'internalisation cellulaire. Les siGLO sont des ARN doubles brins synthétisés par voie chimique et marqué par 6-FAM. Les siGLO sont aussi modifiés chimiquement pour prévenir leur incorporation par RISC et assurer ainsi une localisation optimale dans les cellules.

Les nanoparticules ont été préparées en suivant les étapes décrites dans la section 3.1.2.2. La concentration de siGLO utilisée est de 100nM qui est la concentration des siRNA dans toutes les expériences *in vitro*. Il est recommandé de manipuler à l'abri de la lumière pour diminuer le risque de photoblanchiment des molécules fluorescentes qui marque le chitosane et le siGLO. La transfection a été effectuée selon les procédures détaillées dans la section précédente. Cependant, les cellules ont été ensemencées dans des boites de Petri stériles à fond en verre idéal pour la microscopie (*glass bottom petri*, P35G-1.5-14-C, MatTek, Ashland, MA, USA). Le nombre des cellules (MCF-7/mdr) ensemencées est 40000 cellules par boites. Ce nombre de cellules génère un tapis cellulaire adéquat pour les études de microscopie confocale. 24 heures après l'ensemencement, la transfection avec les nanoparticules chitosane/RITC-siGLO a été effectuée telle que décrit dans la section précédente 3.3.4. Le milieu de transfection a été ensuite aspiré et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS. Une coloration de la membrane cytoplasmique est recommandée afin de discerner les cellules durant l'observation avec le microscope confocal et faciliter les analyses. De ce fait, les cellules ont été incubées pendant 5 min dans 1 ml de Cell MaskTM dilué à une concentration 5 µg/µl avec de milieu de culture. La coloration a été suivie par deux lavages avec du PBS. Ensuite, 2 ml de milieu de culture ont été ajoutés dans les boites de pétri pour entamer l'observation sous microscope confocal. L'observation des cellules transfectées a été effectuée, sur plusieurs zones du tapis cellulaire, avec le microscope confocal Zeiss LSM510 META Axioplan 200 (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON, Canada) en utilisant les longueurs d'onde suivantes : la longueur d'onde d'excitation 543 nm (avec le filtre passe-bande pour l'émission 565/615 nm) a été utilisée pour visualiser RITC, pour le FAM la longueur d'excitation est 494 nm (le filtre passe-bande utilisé pour l'émission 510/520 nm), la longueur d'onde d'excitation pour visualiser le Cell Mask est 633 nm (avec le filtre passe-bande d'émission 644/676).

Le chitosane marqué avec RITC a été visualisé avec une couleur rouge alors que les

siGLO sont affichés en vert. Le chevauchement de ces deux couleurs abouti une couleur jaune qui correspond aux nanoparticules formées avec chitosane-RITC/siGLO.

3.3.6 Étude de la toxicité cellulaire des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA en utilisant la technique d'Alamar bleu

L'innocuité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été évaluée en utilisant le test Alamar bleu. Cet essai utilise un indicateur colorimétrique de croissance cellulaire basé sur l'évaluation de l'activité métabolique. Le composé actif de l'Alamar bleu (resazurin) ne présente aucune fluorescence. Une fois pénétré à l'intérieur de la cellule vivante, le resazurin est réduit à un produit fluorescent (resorufine). Cette conversion est due à l'activité métabolique des cellules vivantes ce qui permet une mesure quantitative de la cytotoxicité et la viabilité cellulaire.

Une étape d'ensemencement a été effectuée dans une plaque de 96 trous. Les cellules de type MCF-7/mdr ont été ensemencées en raison de 5000 cellules par trou. La transfection avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été effectuée 24 heures après, en suivant les instructions détaillées dans la section 3.3.4. La transfection a été réalisée à pH 6.5 et en présence du FBS. Ensuite, 48 heures après la transfection, le milieu a été aspiré et remplacé par du milieu de culture (RPMI 1640) contenant 10% d'Alamar bleu. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Une mesure de l'absorbance a été effectuée avec TECAN Infinite® 200, à 570 nm et en normalisant à 600 nm. L'activité métabolique des cellules a été évaluée en calculant le pourcentage de réduction de l'Alamar bleu par rapport aux cellules non transfectées. Les résultats ont été analysés en se référant à la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'Alamar bleu} = \frac{(O_2 \times A1) - (O_1 \times A2)}{(O_2 \times P1) - (O_1 \times P2)} \times 100$$

Avec O₂= coefficient d'extinction molaire de l'Alamar bleu oxydé à 600 nm (117216)

O₁= coefficient d'extinction molaire de l'Alamar bleu oxydé à 570 nm (80586)

A₁= Absorbance des cellules transfectées à 570 nm

A₂= Absorbance des cellules transfectées à 600 nm

P₁= Absorbance des cellules non transfectées à 570 nm

P₂= Absorbance des cellules non transfectées à 600 nm

3.3.7 Évaluation de silençage génique suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

3.3.7.1 Extraction des ARN totaux et le contrôle de leur qualité

Le but de la présente expérience est d'évaluer l'effet des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à déclencher la voie d'ARN interférente et inhiber sélectivement l'ARNm codant pour la Pgp, protéine membranaire responsable de la chimiorésistance chez les cellules MCF-7/mdr. Tel que mentionné dans les sections antérieures, les études *in vitro* commencent toujours par une étape d'ensemencement cellulaire. Les cellules (de type MCF-7/mdr et MCF-7 sensible) ont été ensemencées dans une plaque de 24 puits stérile (*Corning*) en raison de 40000 cellules par puits. La transfection a été effectuée dans les 24 heures qui suivent l'ensemencement en suivant le cheminement décrit dans la section 3.3.4. En effet, les cellules ont été transfectées par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA aboutissant à une concentration finale de MDR1-siRNA équivalente à 100 nM. Les formulations de chitosane 92-10 et 92-150 ont été utilisées pour la formation des nanoparticules à ratios N : P de 5. De plus, la transfection avec le DharamaFECT a été incorporée comme un contrôle positif de la transfection. L'extraction de l'ARN total a été initiée 24 heures après la transfection. Cette étape suscite l'utilisation d'un kit NucleoSpin® RNA XS en suivant les instructions détaillées par le manufacturier. Le but souhaité durant l'extraction est de récupérer de l'ARN le moins dégradé possible et dépourvu des traces de l'ADN génomique et toute autre protéine. Il est important d'utiliser du matériel *DNase RNase Free* et travailler dans un espace réservé uniquement pour les manipulations de l'ARN. Malgré son cout élevé, la purification de l'ARN total (ARNt) sur des colonnes d'affinité (membrane de silice dans notre cas) représente une méthode rapide, facile et compatible avec de nombreux types d'échantillons (tissu, culture cellulaire...). Étant donné l'absence des solvants organiques et le recours au traitement avec le DNase, la méthode aboutit à une excellente pureté et intégrité de l'ARNt extrait. En outre, l'utilisation d'un agent chaotropique dans ce kit représente un atout majeur pour prévenir la dégradation de l'ARN durant la procédure de l'extraction. En effet, la concentration importante de l'agent chaotropique (dans notre cas thiocyanate de guanidine) aboutit, durant l'incubation avec les cellules, à une dislocation de la membrane cellulaire (en agissant sur les protéines membranaires) et la dénaturation des RNases. D'autres parts, la concentration élevée du thiocyanate de guanidine

favorise l'adsorption des acides nucléiques à la membrane de silice lors de transfert du lysat cellulaire sur la colonne de purification. Ceci est causé par la déshydratation et la formation des ponts d'hydrogènes. Cependant, l'ADN contaminant est également fixé sur la membrane de silice d'où l'ajout du DNase directement sur la membrane de silice afin de l'éliminer. La procédure d'extraction exige deux étapes de lavage pour éliminer les sels et les déchets cellulaires (macromolécules et métabolites). Finalement, l'ajout d'eau stérile *RNase Free* sur la membrane aboutit à la diminution de la force ionique ce qui permet l'élution de l'ARN. Pour assurer la stabilité de l'ARN, l'éluat (environ 35 µl) est stocké à -70°C en minimisant les cycles de congélation et décongélation. Quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, il est important de valider la qualité de l'ARN extrait. Le BioAnalyseur 2100 de Agilent (Agilent Technologie, Mississauga, ON, Canada) a été utilisé pour ce fait. Cet instrument permet une caractérisation de l'ARN purifié et une estimation de leur concentration avec une consommation minimale de l'échantillon. Cette technique représente une électrophorèse miniaturisée sur puce. L'échantillon de l'ARN, déposé dans un puits de la puce, a été migré à travers les microcanaux. L'échantillon a été ensuite injecté dans le canal de séparation induisant une séparation des différents composants de l'ARN. Ces derniers ont été visualisés par fluorescence et représentés sous forme de bande (comparable à celle d'un gel d'électrophorèse) et un électrophorégramme (ensemble de pic). La dégradation de l'ARNr a été identifiée grâce au facteur d'intégrité RIN (*RNA integrity number*) qui est déterminé par le rapport entre les deux bandes d'ARN ribosomiques (ARNr) 28s et 18s et le profil de l'électrophorégramme. Le RIN s'étend entre une échelle de 0 à 10. Un RIN de 0 correspond à une dégradation totale de l'ARN et un RIN de 10 est un ARN de grande qualité.

3.3.7.2 Réaction de transcription inverse à partir de l'ARN total extrait

Cette réaction permet de synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN extrait en utilisant un ADN polymérase ARN dépendant (transcriptase inverse). L'ADNc étant plus stable, il offre plus de flexibilité que l'ARN pour les analyses suivantes. Le kit QuantiTect® Reverse Transcription (205311, QIAGEN, Toronto, ON, Canada) a été utilisé pour accomplir la réaction de la transcription inverse tout en suivant les instructions détaillées par le manufacturier. Un volume de 10 µl de l'ARN purifié a été incubé avec 2µl du tampon *gDNA Wipeout* pendant deux minutes à 42 °C afin d'éliminer l'ADN contaminant résiduel. Ce traitement réduit le risque de l'hybridation de l'ADN génomique contaminant avec les sondes utilisées durant l'étape suivante (q-PCR) ce qui contribue à la précision des données. La solution de la digestion a été

ensuite placée directement sur la glace pour éviter la dégradation de l'ARN. Après la dégradation de l'ADN génomique, la réaction de la transcription inverse a été initiée en incubant le mélange (14 µl) pendant 15 minutes à 42°C avec 7µl un Master Mix qui contient la *Quantriscript reverse Transcriptase*, *Quantriscript RT Buffer*, *RT primer Mix*. Différemment aux méthodes conventionnelles, cette approche ne requiert pas une dénaturation de l'ARN, une hybridation des amorces et aussi une digestion avec RNase H. En effet, *Quantriscript reverse Transcriptase* possède une grande affinité à l'ARN et garanti un rendement élevé d'ADNc même à partir d'ARN ayant des structures secondaires et dont la séquence est riche en GC. Cette enzyme recombinante possède, en plus de sa capacité inhibitrice des RNAses, trois fonctions majeures (activité exonucléasique (RNaseH), activité ADN polymérasique ARN dépendante et une activité ADN polymérasique ADN dépendante) contribuant à la reproductibilité et la sensibilité de la réaction de la transcription inverse. Pour inhiber l'action de *Quantriscript reverse transcriptase*, le mélange réactionnel a été ensuite incubé pendant 3 minutes à 95 °C. La réaction de la transcription inverse a été effectuée dans un thermocycleur programmable Rotor-GeneTM6000 (Corbett Life Science, NSW, Australie). Le produit de la réaction (ADNc) a été ensuite conservé à -20°C pour les utilisations ultérieures.

3.3.7.3 Évaluation du silençage génique par qRT-PCR suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

La qPCR permet de quantifier le niveau d'expression de gène codant pour la Pgp suite à une transfection avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La PCR en temps réel permet la mesure des amplicons via un marqueur fluorescent et durant chaque cycle d'amplification. La quantification du gène d'intérêt peut se faire soit d'une façon absolue après la construction d'une courbe standard, soit d'une façon relative en normalisant par rapport à un gène de référence qui est amplifié en même temps avec le gène cible. Une quantification relative a été choisie dans le cadre de cette expérience avec le recours au glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH comme un contrôle endogène. Un gène de référence, gène endogène ou gène de ménage (*housekeeping gene*) code pour une protéine impliquée dans des fonctions cellulaires de base. Généralement, le gène de ménage (contrôle endogène) est caractérisé par une expression ubiquitaire, stable entre les différents tissus et quelques soit les conditions expérimentales testées. D'autre part, la visualisation des amplicons produits durant la phase exponentielle de la réaction (phase durant laquelle la différence de l'expression génétique devient visiblement apparente) est

assurée par la méthode Taq Man. La technologie de la PCR en temps réel est basée généralement sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent dont l'augmentation du signal est directement proportionnelle à la quantité d'amplissons générés durant la réaction. Tel que mentionné plus haut, la détection quantitative des amplissons a été effectuée par la méthode Taq Man. Il s'agit d'une sonde fluorescente spécifique à la séquence cible qu'on désire la quantifier. Durant l'étape de l'hybridation, la sonde fixe la séquence, mais ne produit aucune fluorescence du fait du principe *Fluorescence resonance energy transfert* (FRET). Une fois stimulé, le fluorochrome émetteur (*reporter*) (ex. FAM : 6-carboxy-fluorocein) fixé à l'extrémité 5' de la sonde, transfère son énergie au fluorochrome suppresseur (*quencher*) (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) qui la dissipe sous forme de chaleur plutôt de l'émettre en fluorescence. Au cours de l'étape de l'elongation, l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase libère le *reporter* de l'environnement suppresseur de *quencher* ce qui aboutit à l'émission et la détection de la fluorescence dont l'intensité est relative aux changements de l'expression génétique. Désormais, la concentration du gène cible à quantifier a été estimée par le cycle seuil C_t (*cycle threshold*). Cette valeur est définie par le nombre de cycles d'amplification où la courbe d'amplification croise la ligne seuil qui est attribué pour discerner clairement la phase exponentielle du bruit du fond. En outre, un calibrateur a été aussi considéré pour analyser les résultats. Le calibrateur correspond, généralement, à un échantillon contrôle (dans notre cas les cellules MCF-7/mdr non transfectées) utilisé comme base pour comparer les résultats. Dans la présente expérience, la méthode $\Delta\Delta C_t$ a été utilisée pour effectuer une quantification relative de l'expression génétique de chaque échantillon. Brièvement, la méthode utilise la formule arithmétique suivante, qui tient en considération la différence ΔC_t entre les valeurs C_t du gène cible, de l'endogène et du calibrateur.

$$\Delta C_t \text{ (échantillon)} = C_t \text{ (gène cible échantillon)} - C_t \text{ (GAPDH échantillon)}$$

$$\Delta C_t \text{ (calibrateur)} = C_t \text{ (gène cible calibrateur)} - C_t \text{ (GAPDH calibrateur)}$$

Ensuite, le $\Delta\Delta C_t$ entre le contrôle et l'échantillon est calculé:

$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ (calibrateur)} - \Delta C_t \text{ (échantillon)}$. Enfin, le ratio d'expression relative d'un gène cible (dans notre cas MDR1) a été déterminé par la formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$

En somme, la deuxième étape dans la démarche de la qRT-PCR est l'amplification par PCR de l'ADNc issu de la réaction de la transcription inverse. L'ABI prism 7900 HT (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) a été utilisé pour quantifier le niveau d'expression du gène d'intérêt (MDR1). L'appareil est un instrument haut débit de PCR en temps réel associé à un lecteur code barre permettant l'identification sécurisée des échantillons. Ce système est aussi pourvu de différents types de blocs compatibles avec des microplaques de type 96 ou 384 puits, dédiés pour une utilisation en mode standard (le temps de la réaction est environ 2 heures) ou en mode *Fast* (le temps de la réaction est réduit à 30 minutes).

Le mélange réactionnel a été préparé de façon à avoir un volume final de 50 µl, volume final approprié pour l'utilisation d'une plaque 96 puits en mode standard. Il est crucial de s'assurer que le bloc dans la machine correspond au bloc standard pour éviter le dommage de la plaque et la perte des données. Pour chaque échantillon, le volume réactionnel a été composé de 3 µl d'ADNc (ce qui équivaut à une concentration finale de 50 ng), 2,5 µl de *Gene expression Assay mixture 20X* qui contient la sonde marquée et les amorces pour amplifier le gène MDR1 (gène d'intérêt qui code pour la Pgp), 25 µl de *TaqMan Universal PCR Master (2X)* qui renferme tous les composants nécessaires pour accomplir une PCR en temps réel y compris *AmpliTaq Gold® DNA polymerase* et 19,5 d'eau *DNAase, Rnase Free*. L'ADN polymérase hautement purifié exige un chauffage à 95°C pendant 10 à 15 minutes pour assurer son activation, réduisant ainsi les amplifications non spécifiques. Le volume réactionnel a été minutieusement transféré au fond des puits de la plaque qui doit être recouverte par la suite par un adhésif optique *ABI PRISM®*. Il est important d'associer à chaque échantillon son contrôle endogène approprié puisqu'on a eu recours à une quantification relative. Pour assurer la reproductibilité des résultats, les échantillons ont été analysés en triplicata de même pour les contrôles endogènes. Après la centrifugation, la plaque a été placée dans le bloc de l'appareil préalablement programmé comme suit : une première étape d'activation de la polymérase à 95°C pendant 10 minutes suivie de 40 cycles dont chaque cycle est réparti en 15 secondes à 95°C pour la dénaturation et 1 minute à 60°C pour l'hybridation et l'elongation. Durant l'ajustement du cycle thermique de la réaction, il est important de fixer le volume réactionnel à 50 µl et aussi de nommer méticuleusement chaque échantillon par sa fonction et la condition à tester. Les résultats ont été ensuite analysés par le logiciel *ExpressionSuite v.1.0.3*.

3.3.8 Étude phénotypique de silençage génique de la protéine cible (Pgp)

Le recours à la qRT-PCR a permis de quantifier et de comparer le niveau de l'ARNm (Transcriptome) entre les différentes conditions expérimentales des cellules transfectées par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Cependant, il est important de vérifier l'influence de ces changements génétiques sur le profil d'expression protéique des cellules transfectées pour mettre en évidence l'effet des nanoparticules sur le phénotype des cellules transfectées. De ce fait, le *Western blot*, un des piliers de la protéomique, a été utilisé pour évaluer l'expression de la Pgp suite à une transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

Cette technique permet une détection et identification d'une protéine spécifique (dans notre cas la Pgp) dans un échantillon biologique. Le *Western blot* utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide afin de séparer des protéines, auparavant dénaturés, selon leur masse moléculaire. Grâce à cette technique, il est possible d'évaluer la concentration de la protéine et analyser la différence de concentration entre les différentes conditions expérimentales.

Tel que détaillé dans les sections précédentes, les expériences *in vitro* débutent constamment par une étape d'ensemencement cellulaire. Les cellules (de types MCF-7/mdr et MCF-7 sensible) ont été ensemencées la veille de la transfection, dans une plaque de 24 trous en raison de 40000 cellules/trou. Ensuite la transfection a été effectuée 24 heures après en suivant les étapes décrites dans la section 3.3.4. La concentration finale des MDR1-siRNA est de 100nM.

3.3.8.1 Lyse cellulaire et extraction des protéines membranaires

48 heures après la transfection, les trous de la plaque ont été vidés via une pipette Pasteur stérile reliée à une pompe à vide. Les cellules ont été ensuite lavées deux fois avec du PBS. Un volume de 500 µl du tampon *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA de SIGMA) a été déposé sur les cellules suivies d'une incubation de 5 minutes sur la glace. Il est recommandé d'assurer une répartition homogène du tampon sur toute la surface du trou. Après l'incubation, le lysat a été transféré dans un tube Eppendorf de 1.5 ml pour effectuer ensuite une centrifugation à 14000g pendant 15 minutes afin de sédentifier les débris cellulaires. Pour augmenter le rendement de l'extraction protéique, une sonification a été réalisée trois fois de suite (30 % amplitude pendant 60 secondes) avec une pause de 90 secondes à chaque fois. Une centrifugation à 14000g a été par la suite effectuée pendant 15 minutes et à 4°C. Le surnageant ainsi récolté a été transféré dans un nouveau tube pour procéder à une quantification des protéines. La

quantification a été effectuée avec le kit *Micro BCA™ Protein* (de Thermo Fisher Scientific) en suivant les instructions détaillées par le manufacturier. En effet, l'acide bicinchoninique (BCA) forme avec les ions Cu⁺ des protéines, un complexe coloré ayant une absorbance optique maximale à 562 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité des protéines existante dans le mélange réactionnel. Une fraction protéique de 25 µg a été bouillie pendant 3 minutes à 100°C dans le tampon de migration (100mM Tris.Cl, 200mM DTT, 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 20% Glycerol, Eau désionisée) pour assurer la dénaturation des protéines. Le SDS (présent dans le tampon de migration) confère aux protéines une charge négative uniforme ce qui permet une migration proportionnelle à la masse moléculaire sur un gel SDS-PAGE de 8%.

3.3.8.2 Migration sur gel SDS-PAGE

Un gel SDS-PAGE de 12% a été utilisé pour la séparation électrophorétique des protéines. Suite à la préparation et la polymérisation du gel, le tampon de migration (25mM Tris, 250mM Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) a été ajouté dans la cuve d'électrophorèse jusqu'à la submersion entière des gels de polyacrylamide. La cuve d'électrophorèse comporte deux gels de polyacrylamide à 12%. Un gel destiné pour le transfert des protéines sur une membrane et l'autre gel a été utilisé pour une coloration au bleu de coomassie. Après l'ajout du tampon d'électrophorèse, un volume contenant 5 µg de protéines dénaturées a été déposé dans les puits du gel. Étant donné que cette étude vise à élucider la variation de l'expression protéique, il est important de migrer des quantités constantes de protéines. La migration a été effectuée à 100V pendant environ 4 heures. Ensuite, une coloration avec le bleu de coomassie a été réalisée sur un des gels de polyacrylamide dans le but de visualiser le profil des protéines extraites directement sur le gel et vérifier la présence des protéines après l'étape d'extraction.

3.3.8.3 Coloration au bleu de coomassie

Après la migration, le gel a été soigneusement démoulé et placé dans une solution de coloration (45% méthanol, 45% eau désionisée, 10% d'acide acétique glacial et 1g/l de bleu de coomassie brillant blue R-250, biorad) pendant 45 minutes sous une agitation lente. La même solution dépourvue de bleu de commassie et contenant 25% méthanol, 68% eau désionisée et 7% acide acétique glacial a été utilisée pour décolorer le gel et mettre en évidence les protéines extraites. Le temps de la décoloration est environ 4 à 8 heures sous une agitation lente et en

changeant plusieurs fois de solution jusqu'à l'apparition des protéines sous forme des bandes bleues sur un fond clair.

3.3.8.4 Transfert des protéines sur membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF)

Durant la migration, la membrane de PVDF a été plongée pendant 2 minutes dans une solution de méthanol à 100%. Ensuite, la membrane et les couches de papier wattman ont été humidifiées dans le tampon de Transfer (48 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, 0.037% SDS, 20% méthanol). Après avoir effectué le montage de la cassette de Transfer, le gel a été déposé sur la membrane de PVDF situé en direction de la face rouge de la cassette puisque les protéines suivent une migration de négative vers le positif. Les différentes couches ont été entassées tout en vérifiant l'absence des bulles d'air afin d'assurer un bon transfert des protéines. Le transfert a été ensuite exécuté pendant une heure et à 100V. Après le transfert, la membrane a été plongée pendant 5 minutes dans *Tris-buffered salin* (TBS) et ensuite 5 minutes dans *Tween20-Tris buffer Saline* (TBST).

3.3.8.5 Blocage de la membrane PVDF

Étant donné que la membrane de PVDF fixe les protéines de façon non spécifique, une étape de blocage a été effectuée pour réduire les interactions non spécifiques entre la membrane et l'anticorps utilisé pour la révélation. En effet, la membrane a été plongée dans 100 ml d'une solution de blocage contenant 5% du lait écrémé en poudre dilué dans TBS-T (10 mM Tris, 15 M NaCl, 10 % de Tween X20) pendant environ 2 heures à température ambiante. Suite au blocage, trois étapes de lavage sont nécessaires dans le but d'enlever l'excès de protéines du lait.

3.3.8.6 Révélation de la Pgp

Afin de révéler la protéine d'intérêt, la membrane a été incubée une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire anti-Pgp (C219, SIG-38710, Covance) dilué à 1 :1000 dans 8 ml de solution contenant 0.5% de lait poudre diluée dans du TBST. La détection de la β-actine, utilisée comme un contrôle endogène, a été effectuée avec l'anticorps primaire anti-β-actine (BA3R, MM-0164, MÉDIMABS). Suite à l'incubation avec l'anticorps primaire, trois lavages (5minutes avec TBST contenant 0.5%) ont été effectués afin d'enlever les anticorps primaires non liés. La membrane a été par la suite incubée avec un anticorps secondaire de chèvre (*Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate*, 12-349, MILLIPORE) dirigé contre une partie espèce-spécifique (souris) de

l'anticorps primaire. Cet anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) a été dilué dans 10 ml de TBST contenant 0.5% du lait en poudre. Une dilution de 1:2000 est suffisante pour avoir un bon signal de détection. La membrane a été ensuite incubée à température ambiante pendant 2 heures avec la solution qui renferme l'anticorps secondaire. Deux lavages avec du TBST ont été effectués deux fois pendant 5 minutes. Étant donné que le tween interfère avec le réactif du kit de détection par chimiluminescence, deux autres lavages ont été effectués avec du TBS pendant 5 minutes. La révélation du complexe protéine-anticorps a été effectuée avec kit de chimiluminescence amélioré (*Enhanced chemiluminescence ECL*). Cette méthode nécessite l'incubation de la membrane avec 1,5 ml du substrat préparé en mélangeant le compostant A (luminol) avec le compostant B (solution de peroxyde). Exposé à l'enzyme HRP présenté sur l'anticorps secondaire, le substrat émet une luminescence proportionnelle à la concentration de la Pgp. Le signal lumineux émis apparaît sur un film photographique Hyperfilm (Kodak) sous forme de bande dont l'intensité dépend de la quantité de la Pgp. L'intensité du signal lumineux a été ensuite quantifiée par le logiciel *Image Studio Lite 4.0*.

3.4 Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel SigmaPlot 12.0. Les résultats ont été exprimés sous forme d'une moyenne \pm l'écart-type. Les expériences ont été répétées deux fois ($n=2$) afin d'assurer la reproductibilité des résultats. Le test paramétrique ANOVA à un seul facteur (*one way ANOVA*) a été choisi pour étudier la différence statistique entre les groupes de moyennes et tester la validité de l'hypothèse nulle (H_0). Après avoir obtenue un test statiquement significatif, il est important de connaître les groupes qui sont particulièrement différents d'où le recours au test post-hoc de Tukey. L'hypothèse nulle représente l'absence de différence significative entre les groupes. p est défini comme la probabilité que l'hypothèse nulle soit vraie. Donc, la différence est considérée statistiquement significative ou très significative si la valeur- p est inférieure à 0,05 (*) ou inférieure à 0,01 (**), respectivement.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

La complexation simple et directe entre la solution de chitosane et siRNA est la première méthode de formation des nanoparticules décrites dans la littérature (Howard et al., 2006). Ce processus rapide et simple a été choisi pour la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La vitesse de complexation et la concentration des siRNA sont parmi les paramètres qui influencent la taille et la stabilité des nanoparticules. Une vitesse de mélange constante et une concentration des siRNA faible (inférieur à 0,1mg/ml) aboutissent généralement à la formation de nanoparticules stables caractérisées par une dispersion homogène de taille (Kasper, Schaffert, Ogris, Wagner, & Friess, 2011; Xu, L. & Anchordoquy, 2011). Les résultats de la caractérisation physicochimique présentés ci-dessous démontrent la stabilité, la taille et la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées avec simple complexation entre le chitosane et MDR1-siRNA.

4.1 Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

La stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA est un paramètre crucial pour évaluer l'efficacité du chitosane comme un système de livraison des MDR1-siRNA. La complexation simple et directe entre le chitosane et les MDR1-siRNA doit aboutir à des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA capables de prévenir la dégradation des siRNA par les nucléases cellulaires et assurer leur livraison dans le cytosol. Les nanoparticules instables risquent de se décomplexer et de relâcher leur cargo prématûrement ou voire même avant de franchir les barrières cellulaires.

La caractérisation physicochimique consiste en fait à évaluer la stabilité des nanoparticules et d'étudier l'influence de ces paramètres sur la forme, la taille et la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

4.1.1 Formation et stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

L'étude du comportement des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à différents pH (6,5, 7 et 8) et durant différents temps d'incubation (0,5, 4 et 20 heures) a permis de déployer les caractéristiques des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. L'étude de l'effet de pH sur la stabilité des nanoparticules est un atout indispensable pour prédire leur comportement lors du

passage dans l'endosome à pH acide et dans la circulation sanguine où le pH d'environ 7,4. Le deuxième paramètre à tester est l'influence du temps d'incubation sur l'intégrité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA depuis le milieu extracellulaire jusqu'au moment du relargage du siRNA dans le milieu intracellulaire.

4.1.1.1 Étude de la stabilité des nanoparticules par la technique de retardement sur gel de polyacrylamide (PAGE)

La stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été évaluée en analysant le profil de migration électrophorétique des siRNA sur gel de polyacrylamide à 13% et le « retardement » causé par leur degré de complexation au chitosane. La décomplexation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA et par conséquent la libération des siRNA se traduit par la visualisation des bandes de siRNA anioniques sur le gel de polyacrylamide coloré au Bromure d'éthidium. Les nanoparticules qualifiées « stables » assurent à cause du caractère cationique du chitosane, une complexation efficace des siRNA contrôlant ainsi leur libération, d'où l'absence des bandes correspondant aux siRNA sur le gel. Dans cette série d'expériences, la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été évaluée suite à la complexation simple et directe des MDR1-siRNA avec le chitosane 92-10 à des ratios N:P de 0,5, 2, 5 et 10. Les profils de migration électrophorétique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA incubées dans un tampon de pH 6,5 sont caractérisés par une absence des bandes de MDR1-siRNA sur le gel (Figure 4-1) et donc un défaut de libération ou une libération contrôlée des MDR1-siRNA. Ces profils ont été observés lors de la migration des nanoparticules formées à un ratio N:P supérieur à 0,5. Donc, l'incubation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA en présence du tampon à pH 6,5 pendant 0,5, 4 et 20 heures améliore la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA formées à des ratios N:P supérieurs à 0,5. À pH neutre (pH 7), un retardement de la migration des siRNA, et par conséquent un contrôle de leur libération, a été observé avec les nanoparticules préparées à des ratios N:P supérieurs à 0,5. À ce pH les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sont relativement stables d'où la libération partielle des siRNA et leur migration sur gel de polyacrylamide. Durant 20 heures d'incubation en présence du tampon à pH 7, les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA présentent le même profil de migration électrophorétique des MDR1-siRNA. Néanmoins, l'incubation des nanoparticules en présence d'un tampon à pH 8 aboutit à une diminution de la densité de charge du chitosane, qui se traduit par une décomplexation des nanoparticules aux ratios N : P 0,5, 2, 5 et la libération des siRNA

confirmées par la présence des bandes sur le gel. Malgré l'effet décomplexant du tampon à pH8, l'excès de chitosane à un ratio N : P de 10 maintient la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA d'où l'absence des bandes correspondant aux siRNA sur le gel de polyacrylamide.

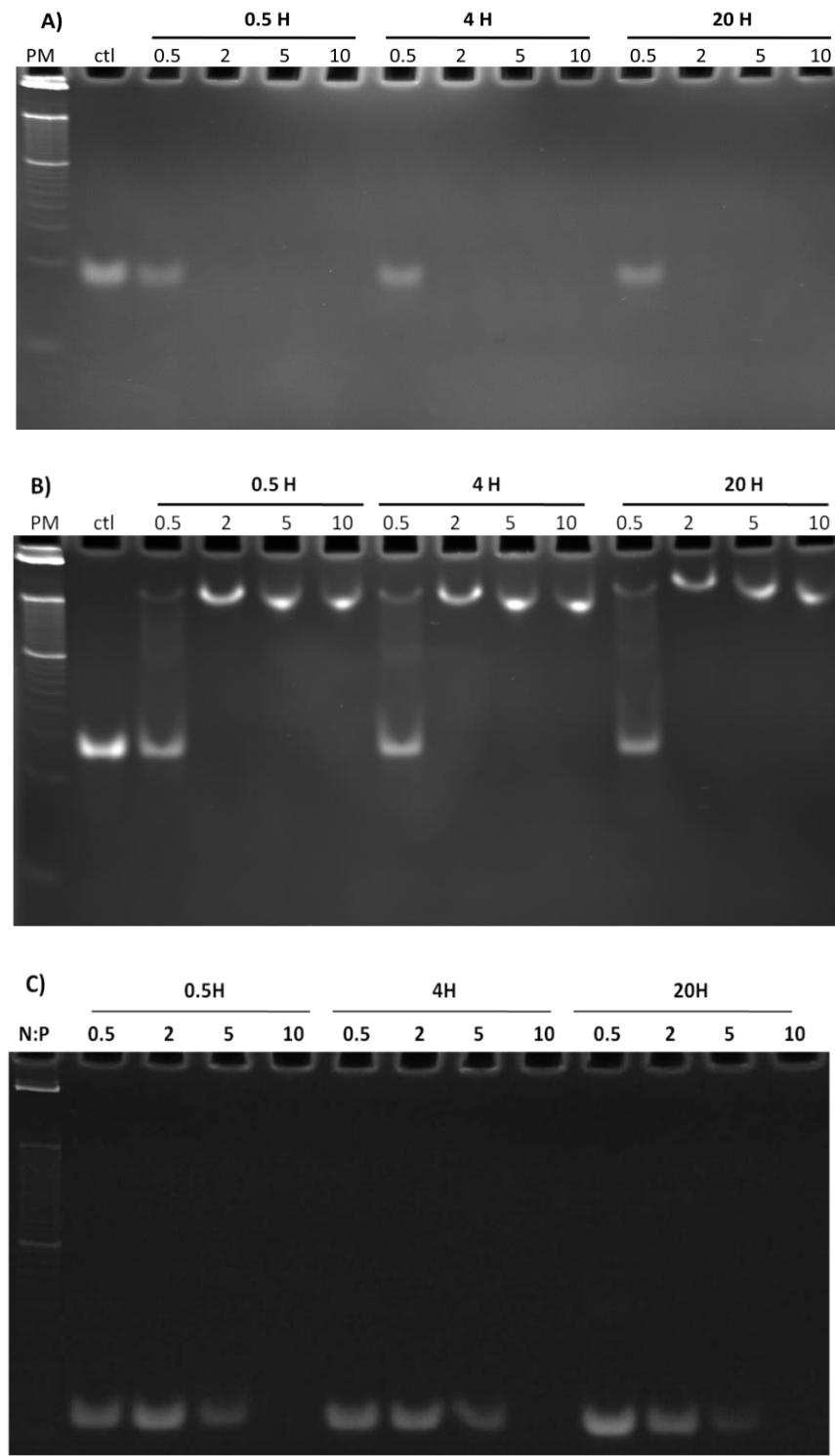


Figure 4-1: Profil de migration électrophorétique des MDR1-siRNA sur gel de polyacrylamide à 13%. Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées avec le chitosane 92-10 à des ratios N:P de 0.5, 2, 5 et 10. La stabilité des nanoparticules a été évaluée à pH 6,5 (**A**), 7 (**B**) et 8 (**C**) pendant 0,5, 4 et 20 heures.

4.1.1.2 Étude de la stabilité des nanoparticules en utilisant le réactif *RiboGreen*

Le réactif *RiboGreen* est un fluorescent utilisé pour la quantification des acides nucléiques. Le *RiboGreen* est peu fluorescent sous sa forme libre, mais sa fluorescence augmente une fois lié aux acides nucléiques. La détection de cette fluorescence permet la quantification des acides nucléiques avec une sensibilité 200 fois plus supérieure à celle du Bromure d'éthidium (Jones, L. J. et al., 1998). Le *RiboGreen* permet la détection d'une concentration des ARN aussi peu que 0.1 ng/μl (Jones, L. J. et al., 1998). Ceci nous a permis de développer une stratégie plus rigoureuse et plus quantitative (contrairement à l'électrophorèse sur polyacrylamide très qualitative) pour étudier la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR-siRNA. Sachant que la concentration des MDR1-siRNA utilisée est de l'ordre de 0,025 μg/μl, la méthode *RiboGreen* consiste à étudier la liaison compétitive sur les siRNA qui s'établit entre le chitosane et le fluorescent. En effet, une complexation efficace par le chitosane empêche la liaison du *RiboGreen* sur les siRNA menant ainsi à une diminution de sa fluorescence. Cependant, un défaut de complexation entraîne la libération des siRNA et leur fixation par le *RiboGreen* aboutissant à une augmentation de la fluorescence.

Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à des ratios N : P 0.5, 2, 5 et 10 afin d'élucider l'effet des paramètres physicochimiques du chitosane sur la stabilité des nanoparticules. Les résultats obtenus avec le *RiboGreen* ont confirmé la stabilité des nanoparticules suite à leur incubation dans un tampon à pH 6,5. En effet, la forte charge cationique du chitosane à pH 6,5 aboutit à la condensation des MDR1-siRNA dans des nanoparticules stables d'où la diminution drastique de la fluorescence (Figure 4-2). À pH acide (pH 6,5), le DDA et la MM du chitosane ne présentent pas un effet sur la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Tant dis que l'augmentation du ratio N : P au-delà de 0.5 aboutit à une chute de la fluorescence expliquée par la formation des nanoparticules plus stables. De plus, la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA n'a pas été affectée par les différents temps d'incubation (0,5, 4 et 20 heures). Ces résultats sont en corrélation avec le profil analysé sur le gel de polyacrylamide. La stabilité des nanoparticules incubées dans un tampon à pH 7 dépend du ratio N : P et de la MM. Les résultats démontrent une diminution de la fluorescence à des ratios N : P supérieur à 0.5 ce qui peut être expliqué par la complexation efficace des siRNA. De plus, la diminution de la fluorescence est plus importante avec les MM élevées (150 kDa et 200 kDa). Un chitosane avec une masse moléculaire élevée est

capable, à cause de la longueur de ses chaines, de condenser les siRNA dans des nanoparticules plus stables. Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA incubées dans un tampon à pH 7 possèdent aussi le même profil de stabilité durant les différents temps d'incubation (0,5, 4 et 20 heures). En revanche, l'incubation des nanoparticules chitosane/MDR-siRNA dans un tampon à pH 8 induit une déprotonation de chitosane et par conséquent un effondrement électrostatique. La diminution de la charge de chitosane aboutit alors à la décomplexation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA et la libération des siRNA qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. Néanmoins, une diminution de la fluorescence a été observée pour les nanoparticules préparées avec un chitosane caractérisé par une masse moléculaire élevée (150 et 200 kDa). Nonobstant la diminution de sa charge cationique, la longueur des chaines de chitosane possède un rôle dans la formation et le maintien de la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. De plus, l'excès de chitosane améliore la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA dans les mêmes conditions alcalines (pH 8) ce qui explique la diminution de la fluorescence observée à un ratio N : P de 10. Les résultats présentés dans la figure 4-4 démontrent aussi que la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA n'a pas été affectée durant les différents temps d'incubation (0,5, 4 et 20 heures).

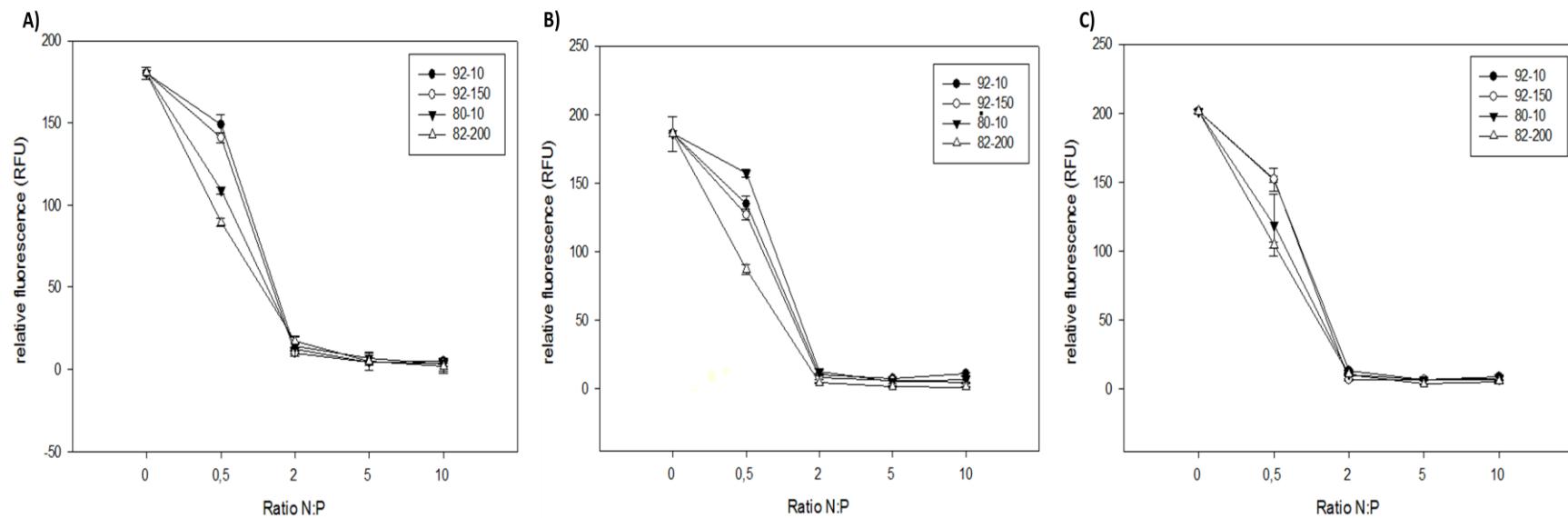


Figure 4-2: Caractérisation de la liaison entre le chitosane et les MDR1-siRNA par l'inhibition de la fluorescence de *RiboGreen* à pH 6,5 (n=3).

Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10 et 82-200 à un ratio N:P 0.5, 2, 5 et 10. La stabilité a été évaluée à différents temps d'incubation: 0,5 heure (**A**), 4 heures (**B**), 20 heures (**C**).

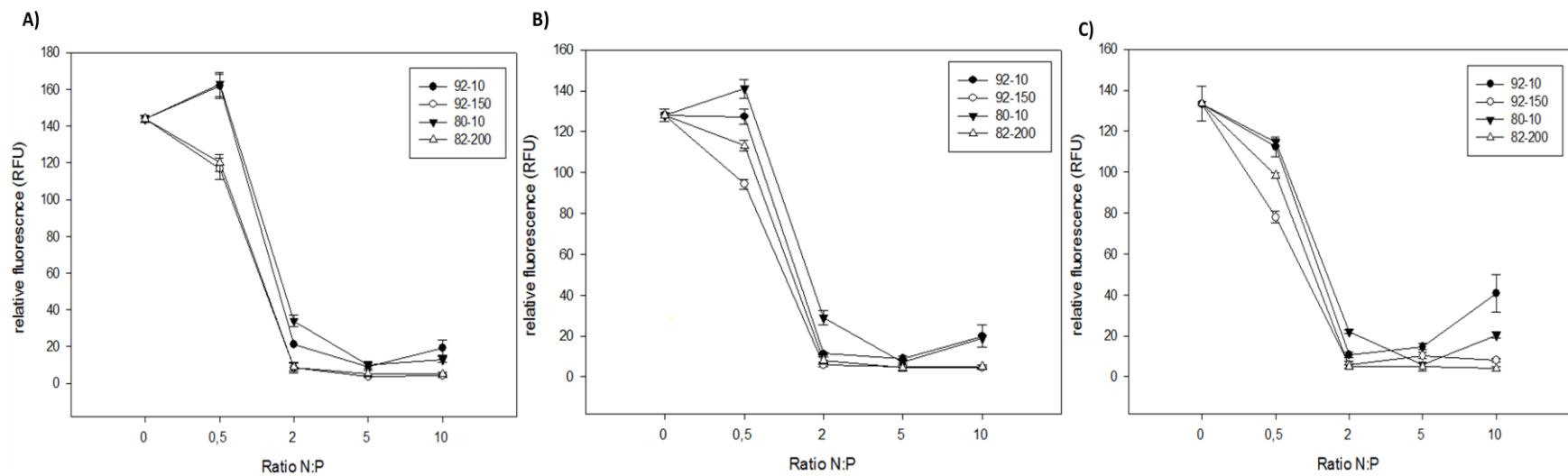


Figure 4-3: Caractérisation de la liaison entre le chitosane et les MDR1-siRNA par l'inhibition de la fluorescence de *RiboGreen* à pH 7 ($n=3$).

Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10 et 82-200 à un ratio N:P 0.5, 2, 5 et 10. La stabilité a été évaluée à différents temps d'incubation: 05 heure (A), 4 heures (B), 20 heures (C).

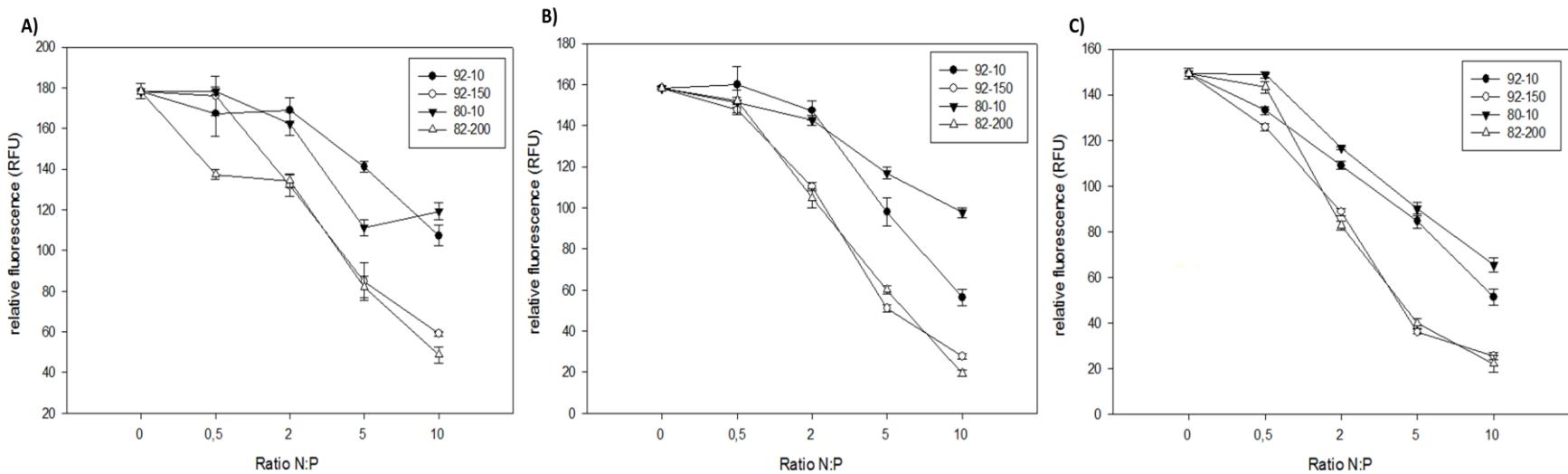


Figure 4-4: Caractérisation de la liaison entre le chitosane et les MDR1-siRNA par l'inhibition de la fluorescence de *RiboGreen* à pH 8 (n=3).

Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ont été préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10 et 82-200 à un ratio N:P 0,5, 2, 5 et 10. La stabilité a été évaluée à différents temps d'incubation: 0,5 heure (A), 4 heures (B), 20 heures (C).

4.1.2 Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

Lors de la conception d'un système de livraison génique, il est crucial de caractériser et de déterminer avec précision la taille et le potentiel zêta (charge de surface). La taille des nanoparticules chitosane-siRNA influence la biodistribution, la capacité de franchir les barrières biologiques, la stabilité, l'efficacité de transfection et aussi le profil de toxicité. En effet, les nanoparticules caractérisées par une faible taille sont capables, une fois dans la circulation sanguine, d'atteindre divers organes. Les nanoparticules dont la taille est supérieure à 100 nm sont phagocytées par le système réticulo-endothélial (RES) tandis que les plus petites échappent à cette barrière cellulaire et possèdent alors un temps de circulation plus prolongé. Néanmoins, l'agrégation des nanoparticules et l'augmentation de leur taille peuvent causer une obstruction des capillaires sanguins ce qui peut conduire à l'embolie et donc un profil de toxicité élevé (Buyens et al., 2012).

Le potentiel zêta est généralement mesuré pour déterminer la charge de surface des nanoparticules. Influencé par la chimie des nanoparticules et les caractéristiques de milieu dispersant, ce paramètre reflète le potentiel électrique des nanoparticules acquis grâce aux ions de la solution. La mesure de potentiel zêta permet de prévoir l'interaction des nanoparticules avec les protéines sériques et aussi avec la membrane cellulaire chargée négativement.

La taille et le potentiel zêta des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sont caractérisés par ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc, UK) en utilisant respectivement la diffusion dynamique de la lumière (DLS : dynamic light scattering) et la diffusion électrophorétique de la lumière (ELS : electrophoretic light scattering).

La méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) est basée sur le principe de diffusion de la lumière par des nanoparticules en suspension. Dans un milieu liquide, les nanoparticules sont soumises à un mouvement brownien qui engendre une diffusion de la lumière à différentes intensités. La mesure de ces fluctuations d'intensité aux cours de temps (à un angle de 173°) permet de prédire la vitesse du mouvement Brownien et déduire par la suite le diamètre hydrodynamique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

La diffusion électrophorétique de la lumière (ELS) évalue l'influence d'un champ électrique, appliqué aux bornes des électrodes, sur le mouvement des nanoparticules chargées. Mesuré par

diffusion de la lumière, le mouvement des nanoparticules dépend de leur charge électrique et migrent à une certaine vitesse (appelée mobilité) vers l'électrode caractérisée par une charge opposée. Le potentiel zêta est déduit alors à partir de la mobilité en choisissant un modèle mathématique bien défini. Les résultats de la taille sont affichés en taille moyenne Z ou Z-average qui est une valeur moyenne pondérée du diamètre hydrodynamique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La taille moyenne Z augmente avec la taille des nanoparticules et représente le paramètre de référence en mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière. Ce paramètre hydrodynamique désigne seulement les nanoparticules en solution liquide.

Les résultats présentés dans le tableau 4.1 montrent une variation de taille de 80 à 230 nm pour les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à un ratio N : P de 5 et 10. Une influence de la MM du chitosane a été observée sur la variation de la taille des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA (Figure 4-5). Alors que le DDA et le ratio N : P ne possèdent pas un effet sur la taille. L'augmentation de la MM du chitosane aboutit à la formation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA caractérisées par une taille plus grande. Pour les mêmes ratios N : P, la taille des nanoparticules préparées avec le chitosane 92-150 et 82-200 est visiblement supérieure à celle préparées avec le chitosane 92-10 et 80-10 ($p < 0,01$).

La charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA est représentée par le potentiel zêta. Ce paramètre, déterminé à partir de la mobilité électrophorétique des nanoparticules, est exprimé en Volts (V). Étant donnée la faible différence entre les valeurs mesurées, le millivolt (mV) est l'unité la plus couramment utilisée pour désigner le potentiel zêta.

Les résultats montrent une variation de charge de 13 à 20mV pour les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à un ratio N : P de 5 et 10 (Tableau 4-1). Une influence de DDA et du ratio N : P a été observée sur la variation de la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Alors que la MM du chitosane ne présente pas un effet sur la charge. Pour le même ratio N : P et indépendamment de la MM, une augmentation de DDA aboutit à des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA caractérisées par une charge plus élevée. Les résultats présentés dans la figure 4-6, montrent que la variation de DDA de 80 à 92 aboutit à une augmentation significative ($p < 0,01$) de la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. De même, l'augmentation du ratio N : P de 5 à 10 génère des nanoparticules caractérisées par une charge plus élevée.

Tableau 4.1: Valeurs présentant la taille, le potentiel zêta et PDI des nanoparticules préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à des ratios N:P 5 et 10.

siARN	Chitosane	Taille par DLS (nm)	Potentiel ζ (mV)	PDI
MDR1	92-10-5	83,85 \pm 5,33	24,38 \pm 1,82	0,24 \pm 0,01
MDR1	92-10-10	99,28 \pm 1,06	30,7 \pm 1,83	0,22 \pm 0,009
MDR1	92-150-5	138,30 \pm 5,50	22,85 \pm 1,38	0,19 \pm 0,009
MDR1	92-150-10	148,66 \pm 5,11	29,93 \pm 2,14	0,26 \pm 0,006
MDR1	80-10-5	83,65 \pm 2,13	13,195 \pm 3,03	0,24 \pm 0,008
MDR1	80-10-10	104,19 \pm 7,70	20 \pm 1,84	0,24 \pm 0,017
MDR1	82-200-5	154,78 \pm 7,54	18,05 \pm 2,66	0,23 \pm 0,012
MDR1	82-200-10	233,55 \pm 4,72	17,22 \pm 1,94	0,33 \pm 0,043

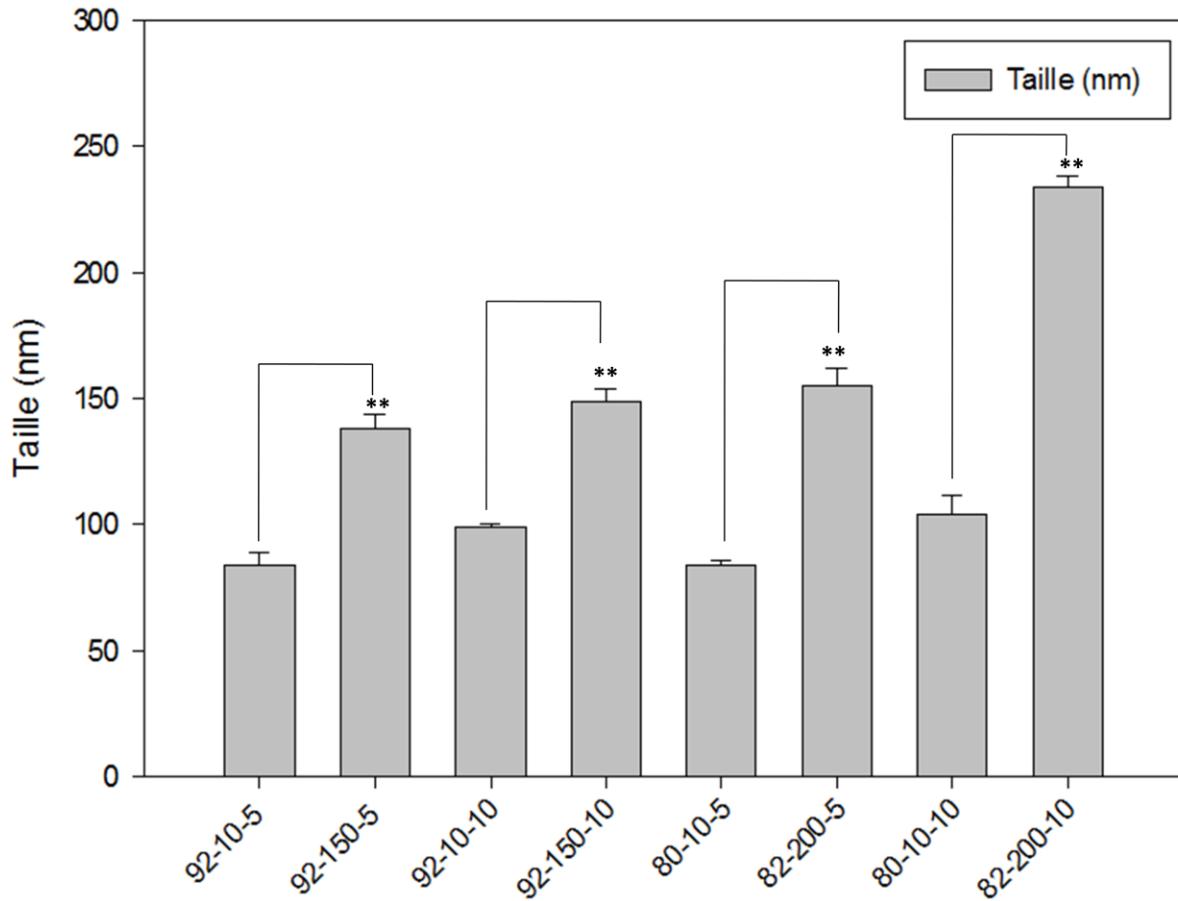


Figure 4-5: Influence de la variation de la MM du chitosane sur la taille des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. ($n=3$, $p^{**}<0,01$).

L'augmentation de la MM du chitosane aboutit à la formation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA caractérisées par une taille plus grande. Pour les mêmes ratios N : P, la taille des nanoparticules préparées avec le chitosane 92-150 et 82-200 est respectivement supérieure à celle préparées avec le chitosane 92-10 et 80-10 ($p < 0,01$).

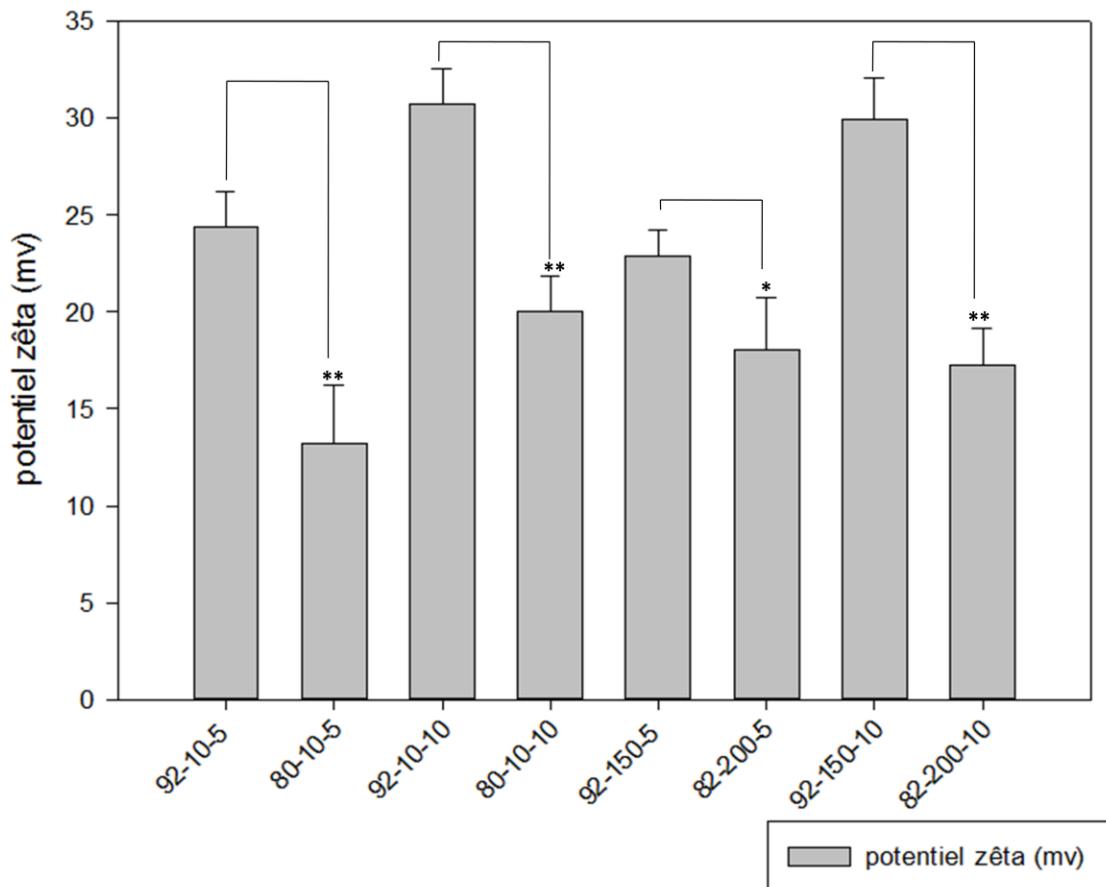


Figure 4-6: Influence de la variation de DDA du chitosane sur la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. ($n=3$, $p^{**}<0,01$, $p^*<0,05$).

L'augmentation de DDA et du ratio N : P aboutit à des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA caractérisées par une charge plus élevée. La variation de DDA de 80 à 92 induit une augmentation significative de la charge des nanoparticules ($p <0,01$).

4.1.3 Analyse de la taille et des formes des nanoparticules par microscopie électronique à balayage environnemental

La microscopie électronique à balayage environnemental (*ESEM* : *environmental scanning electron microscopy*) permet d'analyser la taille et la morphologie des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Les nanoparticules ont été préparées avec les chitosane 92-10, 80-10, 92-150 et 82-200 à un ratio N : P de 5. Les résultats présentés dans les images montrent que les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA possèdent généralement une forme sphérique (Figure 4-7, a et b). Néanmoins, une augmentation de la proportion des nanoparticules en forme de tige allongée a été observée pour les nanoparticules préparées avec du chitosane caractérisé par une masse moléculaire élevée (Figure 4-7, c et d).

Une dispersion homogène des formes sphériques a été observée pour les nanoparticules préparées avec de chitosane 92-10 et 80-10 à un ratio N : P de 5. Tandis que l'observation des images pour les nanoparticules à base de chitosane 92-150 et 82-200 à un ratio N : P 5 révèlent une agrégation des nanoparticules avec la présence d'une certaine hétérogénéité des formes (forme de tige allongée et forme sphérique).

Les résultats de l'ESEM démontrent aussi que le chitosane caractérisé par une MM élevée aboutit à la formation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA de plus grande taille ce qui supporte les résultats obtenus par DLS.

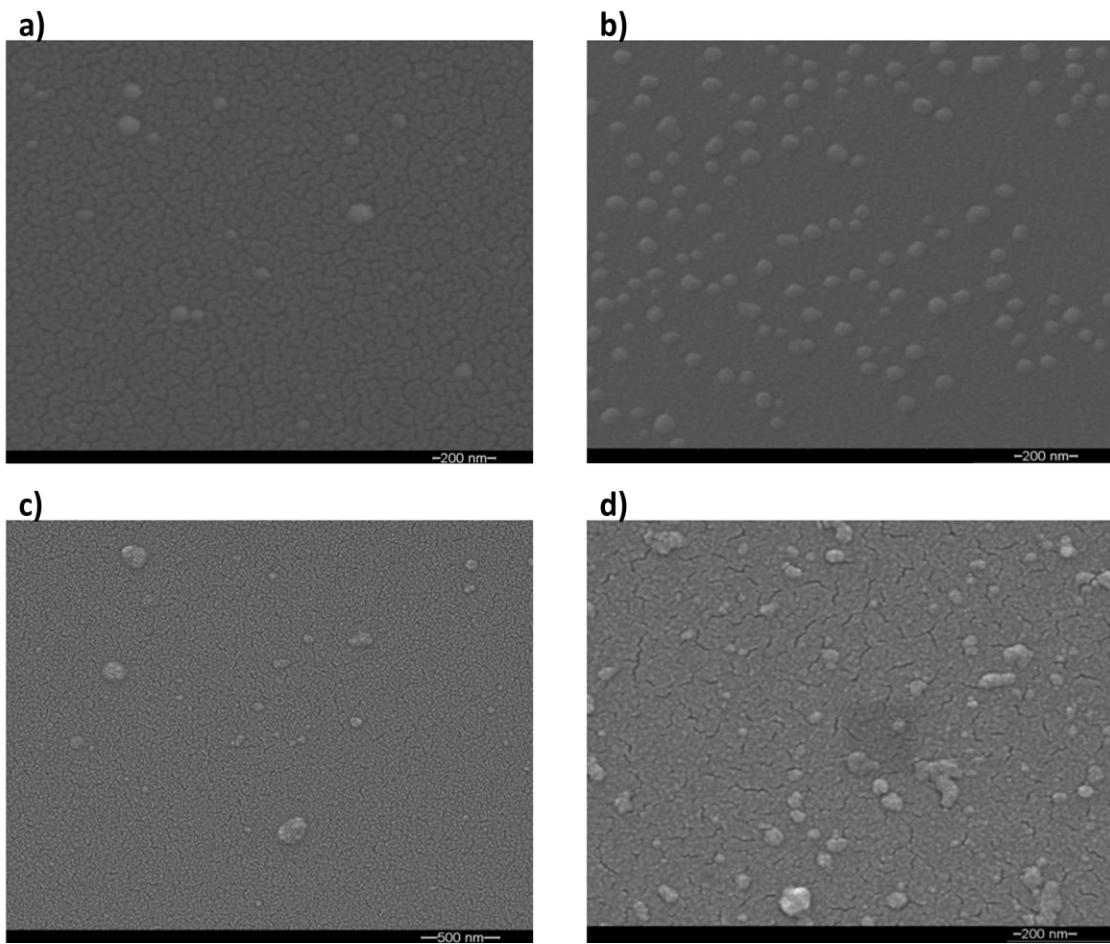


Figure 4-7: Images des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA en microscopie électronique.

L'analyse par microscope électronique à balayage (ESEM) démontre la taille et la morphologie des nanoparticules préparées avec les formulations de chitosane suivantes : a) 80-10-5, b) 92-10-5, c) 82-200-5, d) 92-150-5.

4.2 Évaluation du potentiel de chitosane comme un système de livraison des siRNA, ciblant le gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr (Étude *in vitro*)

Suite à la caractérisation physicochimique, il est important d'évaluer *in vitro* l'efficacité de chitosane comme un système de livraison des siRNA. Les cellules MCF-7/mdr ont été choisies comme un modèle cellulaire pour accomplir cette étude. L'étude *in vitro* permet d'évaluer l'impact des paramètres physicochimiques du chitosane sur la livraison des siRNA et par conséquent leur potentiel à induire un silençage du gène MDR1, responsable de la chimiorésistance.

4.2.1 Évaluation de l'expression du gène (MDR1) dans les cellules MCF-7/mdr

La résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie constitue la cause essentielle de l'inefficacité des agents anticancéreux. Diverses études indiquent l'existence de plusieurs phénotypes impliqués dans la chimiorésistance. Connue par sa capacité à croître dans une concentration allant jusqu'à 10 µM de Doxorubicine, les cellules MCF-7/mdr sont caractérisées par des modifications cytogénétiques responsables de ce caractère de résistance. Parmi les modifications cytogénétiques les plus marquantes est la surexpression du gène MDR1 codant pour la Pgp, protéine membranaire responsable de l'efflux actif des agents anticancéreux. Comparativement à la lignée sensible, l'ARNm du gène MDR1 est 60 fois plus amplifié chez les cellules MCF-7/mdr. Choisi comme étant une cible par les MDR1-siRNA, il est important de supporter la littérature et confirmer ainsi l'expression du gène MDR1 par ces cellules.

Les MDR1-siRNA utilisés pour silencer l'expression du gène MDR1 ciblent plusieurs séquences de l'ARNm codant la Pgp (Figure 4-8). Rétrotranscrits en ADNc, les fragments ciblés par les MDR1-siRNA ont été amplifiés par PCR. En effet, les paires d'amorces utilisées ont été conçues de façon à encadrer la région ciblée par les MDR1-siRNA et assurer une amplification spécifique des fragments caractérisés par les tailles 2904, 807, 1100 et 1165 paires de base (pb).

Après une migration électrophorétique des produits de la PCR sur un gel d'agarose à 3%, la coloration au bromure d'éthidium révèle la présence des bandes aux tailles attendues (807, 1100 et 1165 pb). Ces bandes qui correspondent à une amplification spécifique des fragments du gène MDR1, ont été observées dans les puits contenant l'ADNc des cellules MCR-7/mdr (puits 2, 3, 4)

et MCF-7 sensible (puits 6, 7, 8). Ces résultats supportent les données de la littérature et confirment l'expression du gène cible (MDR1) dans les deux lignées cellulaires. La bande observée au niveau de puits 9 représente une amplification de l'ADNc de FGF-18 choisi comme contrôle positif. Tous ces que le contrôle négatif se retrouve au niveau des puits 10, 11, 12, 13, 14. Ces puits, caractérisés par une absence de bande, permettent de vérifier l'absence de contamination durant la réaction de la PCR (Figure 4-9).

Afin de confirmer l'identité des fragments amplifiés, l'ADN des bandes a été extrait à partir du gel à l'aide de kit *QIAquick gel extraction*. La réaction de séquençage a été réalisée sur les deux séquences sens et anti sens des deux brins de l'ADN. Accompli par les services de séquençage Sanger de l'IRIC, la réaction séquençage a été effectuée avec le *BigDye® Terminator v3.1* suivi d'une migration par électrophorèse en capillaire en utilisant le séquenceur automatique ABI 3730. L'analyse des chromatogrammes ainsi obtenus permet de générer des séquences nucléotidiques dont l'identité a été confirmée par BLAST (basic local alignment search tool). En effet, l'alignement des séquences obtenues avec toutes les séquences de la base de données GenBank ® révèle une homologie avec le gène MDR1 (numéro d'accès Genbank NM 000927). Les résultats de séquençage validé par BLAST, supportent les données de la littérature et confirment l'expression du gène MDR1 ciblé par les MDR1-siRNA. Surexprimé chez les cellules MCF-7/mdr, le gène MDR1 code la Pgp (1280 acides aminés) protéine membranaire responsable de la chimiorésistance en favorisant l'efflux actif de la Doxorubicine à l'extérieur de la cellule cancéreuse.

MDR1-siRNA1
Sens 5' GCUGAUCUAUGCAUCUUUUU 3'
Anti sens 3' UUCGACUAGAUACGUAGAAUA 5'
MDR1-siRNA 2
Sens 5' GACCAUAAAUGUAAGGUUUUU 3'
Anti sens 3' UUCUGGUAUUUACAUUCCAAA 5'
MDR1-siRNA3
Sens 5' GAAACUGCCUCAUAAAUUUUU 3'
Anti sens 3' UUCUUUGACGGAGUAAA 5'
MDR1-siRNA4
Sens 5' UCGAGUCACUGCCUAAUAAUU 3'
Anti sens 3' UUAGCUCAGUGACGGAAU 5'

Figure 4-8: Les séquences des quatre duplex MDR1-siRNA utilisés en cocktail et fournies par Dharmacon sous le nom de «siGENOME SMART pool».

siGENOME SMART pool représente une combinaison de 4 duplex MDR1-siRNA ciblant des régions différentes de l'ARNm (4718 pb) codant pour la Pgp. Les quatre MDR1-siRNA sont caractérisés par un débordement en 3' de dinucléotide UU et possède aussi un groupement phosphate à l'extrémité 5'. Les siRNA ayant un débordement en 3' sont connues non-immunostimulants alors que le groupement phosphate à l'extrémité 5' du brin guide favorise l'incorporation dans RISC, une étape clé dans le mécanisme de silençage génique par ARN interférence.

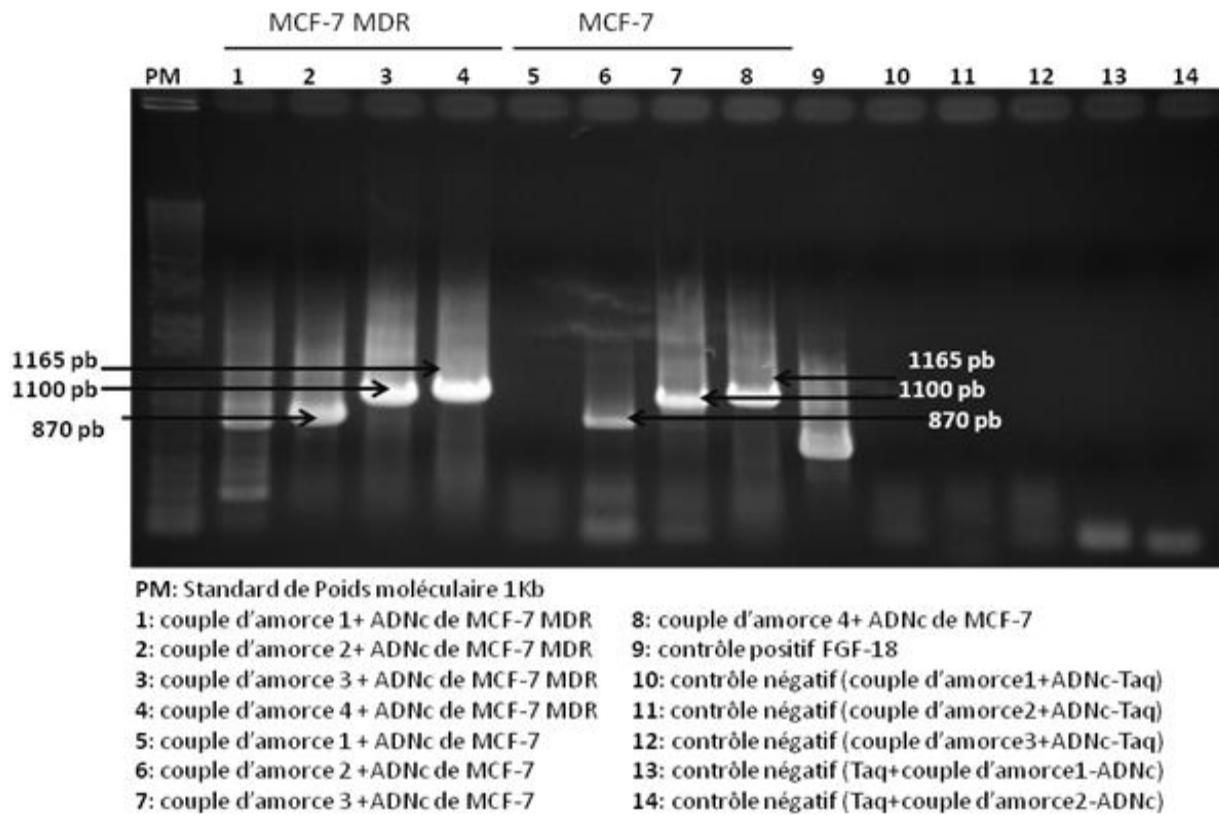


Figure 4-9: Profil de migration électrophorétique des produits de la RT-PCR sur un gel d'agarose à 3%.

Suite à la migration électrophorétique, la coloration au bromure d'éthidium révèle la présence des bandes aux tailles attendues. Les flèches montrent des bandes aux tailles suivantes: 807, 1100 et 1165 pb. Ces bandes correspondent à une amplification spécifique des fragments du gène MDR1, ont été observées dans les puits contenant l'ADN des cellules MCR-7/mdr (puits 2, 3, 4) et MCF-7 sensible (puits 6, 7, 8). La bande observée au niveau de puits 9 représente une amplification de l'ADN de FGF-18 choisi comme contrôle positif. Tous ces puits, caractérisés par une absence de bande, permettent de vérifier l'absence de contamination durant la réaction de la PCR.

AACACTTGATTACCATTTAAAGGCTATCATTACTCTTACCTGTGAAGAGTAGAACATGAAGAAATCTACTTTATTCAGATATT
 CTCAGATTCTAAAGATTAGAGATCATTCTCATTCTCTAGGACTACTCCTAGGAAGCAACCAGATAAAAGAGAGGTGCAAC
 GGAAGGCCAGAACATTCCCTCGAAATTCAACCTGTTCGAGTTCTCGAGGAATCACCACTCAGTCATCCGGCCGGAGCAGT
 CATCTGTGGTAGGGCTGATTGGCTGGCAGGAACAGCGCCGGCGTGGCTGAGCACAGCCGCTCGCTCTTTGCCACAGGAAG
 CCTGAGCTCATTGAGTAGCGGCTCTCCAAGCTCAAAGAACAGCAGAGGCCGCTGTTCGTTCTCTAGGTCTTCCACTAAAGTCGG
 AGTATCTTCTCCAAAATTTCACGTCTGGTGGCCGTTCAAGAGAGCGCGAGGTGGA **ATG** ATCTTAAGGGGACCGCAATGGAGG
 AGCAAAAGAAGAAACTTTTAAACTGAAACAATAAAAGTAAAAAGATAAGAAGGAAAAGAACCAACTGTCACTGTATTTCAT
 GTTTCGCTATTCAAATTGGCTTGACAAGTTGATATGGTGGGAACTTGGCTGCCATCATCCATGGGCTGGACTTCCTCAT
 GATGCTGGTGGTGGAGAAATGACAGATATCTTGCCTAAAGCAGGAATTAGAAGATCTGATGTCAAACATCACTAATAGAACTG
 TATCAATGATAACAGGGTCTTCATGAATCTGGAGGAAGACATGACCAGGTATGCCATTATTACAGTGGATTGGTGGCTGG
 GGTGCTGCTTACATTAGGTTCATTTGGTGCCTGGCAGCTGGAAAGACAAATACACAAAATTAGAAAACAGTTTTCTATGCTAT
 AATGCGACAGGAGATAGGCTGGTGTGCACGATGTTGGGAGCTTAACACCCGACTTACAGATGATGTCCTCAAGATTAATGA
 AGGAATTGGTGACAAAATTGGAAATGTTCTTCAGTCATGGCAACATTTTCACTGGGTTATAGTAGGATTACACGTGGTGGAA
 GCTAACCCCTGTGATTTGGCATCAGTCTGTTGGACTGTCAGCTGTCTGGCAAAGATACTATCTCATTACTGATAA
 AGAACTCTTAGCGTATGCAAAAGCTGGAGCAGTAGCTGAAGAGGTCTTGCAGCAATTAGAACTGTGATTGCAATTGGAGGACAAA
 GAAAGAACTTGAAAGGTACAACAAAATTAGAAGAAGCTAAAAGAATTGGATAAAAGAAAGCTATTACAGCAATATTCTATAGG
TGCTGCTTCC **GCTGATCTATGCATTTAT** GCTCTGGCTTCTGGTATGGACCACCTGGCTCTCAGGGAAATTCTATTGG
 ACAAGTACTCACTGTATTCTTCTGATTAATTGGGCTTTAGTGTGGACAGGCATCTCAAGCATTGAAAGCATTGCAATGC
 AAGAGGAGCAGCTTATGAAATCTCAAGATAATTGATAATAAGCAAGTATTGACAGTATTGAAAGTGGGACAAACAGATAA
 TATTAAGGGAAATTGGATTACAGAAATGTCACCTCAGTTACCCATCTGAAAAGAAGTTAAGATCTGAAGGGTCTGAACCTGAA
 GGTGAGAGTGGCAGACGGTGGCCCTGGTGGAAACAGTGGCTGTGGGAAGAGCACAACAGTCCAGCTGATGCAAGGGCTATGA
 CCCACAGAGGGATGGTCAGTGGTGTGGACAGGATATTAG **FACCATAATGTAAGGTTT** CTACGGGAAATTGGTGTGGTGG
 TCAGGAACCTGTATTGTTGCCACCACGATAGTGAACACATTGCTATGGCGTGGAAATGTCACCATGGTGGAGATTGAGAAAGC
 TGTCAAGGAAGCCAATGCTATGACTTTATCAT **CAAACCTGCCATAAATT** GACACCCCTGGTGGAGAGAGAGGGGCCAGTTGAG
 TGGT **GGCAAGCAGAGGATGCCATTGCACTGCCCCCTGGTGCACGTCAGTGGCTCTGGATAAGGCCAGAAAAGGTCG**
 GGACACAGAAAAGCGAAGCAGTGGTCAGGGCTCTGGATAAGGCCAGAAAAGGTCGACCCATTGTGATAGCTCATGTTGTC
 TACAGTCTGTAATGCTGACGTCATGCTGGTTGATGGACTGATTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGAAGGAAATCATGATGA
 AGGCAATTACTGTCACAACTGCAAGACAGCAGGAAATGAGTTGAAATTAGAAAATGCACTGATGAACTCCAAAAGTGA
 TGATGCCATTGAAATGTTCAATGATCCAGTCAGTCAACTCGTAAAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTACAAGC
 CCAAGACAGAAAAGCTTAGACCAAAAGGGCTCTGGATGAAAGTATACTCCCTGTTGGAGGATTATGAAGCTAAATTAAAC
 TGAATGGCCTTATTGTTGTTGGTGTATTGTCACATTAAATGGAGGCTGCAACCAGCATTGCAATAATATTCTAAAGAT
 TATAGGGGTTTACAAGAATTGATGATCCTGAAACAAAAGCAGAAATAGTAACTGTTTCACTATTGTTCTAGCCCTTGG
 TATTCTTTTATTACATTTCCTCAGGGTTTCACATTGCAAGCTGGAGAGATCCTCACCAAGCGGCTCGATACATGGTT
 CCGATCCATGCTCAGACAGGATGTGGTTGATGACCTTAAACACCACTGGAGCATTGACTTACCCAGGCTGCCATTGATGC
 TGCTCAAGTTAAAGGGCTATAGGTTCCAGGCTGCTGTAATTACCAAGATAAGCAAAATCTGGGACAGGAATAATTATCC
 CATCTATGGTGGCAACTAACACTGTTACTCTAGCAATTGACCCATCATTGCAATAGCAGGAGGTGTTGAAATGAAAATGTC
 TGACAAGCACTGAAAGATAAGAAAGACTAGAAGTGTGGAAAGATCGCTACTGAA **G** ATAGAAAACCTCCGAACCGTTGTT
 TTTGACTCAGGAGCAGAAGTTGAACATATGATGCTCAGAGTTGCGAGGTACCATACAGAAAATCTTGGAGGAAAGCACACATCT
 TGGATTACATTTCCTCACCCAGGCAATGATGTTTCTATGCTGGATGTTCCGGTTGGAGGCTACTGGTGGCACATAA
 ACTCATGAGCTTGAGGATGTTCTGTTAGTATTTCAGCTGTTGCTTGGTGCCTGGCGTGGGCAAGTCAGTTCAATTGCTCC
 TGACTATGCCAAAGCCAAAATATCAGCAGCCCACATCATGATCATTGAAAAACCCCTTGTGATGACAGCTACAGCACGGAG
 CCTAATGCCAACACATTGAAAGGAATGTCACATTGGTGAAGTTGATTCACACTATCCCACCCGAGGACATCCAGTGTCTCA
 GGGACTGAGCTGGAGGTGAAGAAGGGCCAGACGCTGGCTCTGGTGGCAGCAGTGGCTGGGAAGAGCACAGTGGCCAGCT
 GGAGCGGTTCTACGACCCCTGGCAGGGAAAGTGTGCTGTTGATGGCAAAGAAATAAGCAGTGAATGTTCACTGGCTCCAG
 CCTGGGCATCGTGTCCCAGGAGGCCATCTGTTGACTGCAGCATTGCTGAGAACATTCGCTATGGAGACAACAGCCGGTGG
 ACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCAAAGGAGGCCAACATACATGCCATTCA **TCGAGTCAGTGCCTAATAA** ATATAGCA
 ACTAAAGTAAACTCAGCTCTGGTGGCAGAAACAAACGCAATTGCAAGCTGCTGCCCCCTGTTAGACAGCCTCATATTGCT
 GGATGAAGGCCAGTCAGCTGCTGGATACAGAAAGTGAAGAGGTGTTGCAAGAAGCCCTGGACAAAGCCAGAGAAGGCC
 GACACTGGCAGCTGCTCACCACATCCAGAATGCAACTAACAGGATCTATTTCATGGTCAGTGTCCAGGAGTCAGGAG
 TCAGCAGCTGCTGGCACAGAAAGGCATCTATTTCATGGTCAGTGTCC **AGGCTGAAACAGGCCA** **WGA** ACTCTGACTGTATG
 AGATGTTAAATACTTTAATATTGTTAGATGACATTATTCAAAGTTAAAGCAAACACTTACAGAATTATGAAGAGGTATC
 TGTTTAACATTCTCAGTCAGTCAAGTTCAGAGACTTCAGTAATTAAAGGAACAGAGTGAAGAGACATCATCAAGTGGAGA
 AATCATAGTTAAACTGCAATTAAATTATAACAGAATTAAAGTAGATTAAAGATAAAATGTGAATTGTTATTT
 CCATTGGACTGTAACTGACTGCCTGCTAAAGATTATAGAAGTAGAAAGTATTGAAATGTTGCATAAAGTGTCTATAATAA
 AACTAAACTTCATGTGAAA

Figure 4-10: Séquence de 4718 acides nucléiques de l'ARNm du gène MDR1 humain codant pour la protéine Pgp. Référence NCBI de la séquence : NM_000927.

Les encadrés correspondent, dans l'ordre, au site d'initiation (codon d'initiation) et au site de terminaison (codon-stop). Les zones en gris, rouge et cyan se chevauchant correspondent respectivement aux séquences d'hybridation des paires d'amorces 2, 3 et 4 utilisées pour confirmer la présence du gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr. Pour confirmer l'identité des séquences amplifiées par ces paires d'amorces, un séquençage a été effectué sur l'ADN extrait à partir du gel. Suite à l'analyse de l'électrophorégramme, les séquences obtenues ont été blastées sur la base de données GenBank ® afin de trouver les régions ayant des zones de similitude avec les séquences trouvées. Les soulignés correspondent aux régions séquencées en utilisant ces paires amorces. Les zones en rouges correspondent aux différentes séquences ciblées par le cocktail de MDR1-siRNA. Les MDR1-siRNA1, le MDR1-siRNA2, le MDR1-siRNA3 et le MDR1-siRNA4 ciblent respectivement les séquences (1405-1423), (1870-1888), (2035-2053) et (3966-3984).

```

MDLEGDRNGGAKKNFFKLNKSEDKKEKKPTVSFSMFRYSNWLDKLYMVGTAAIIHGAGL
PLMMLVFGEMTDIFANAGNLEDLMSNITNRSDINDTGFHMNLEEDMTRYAYYSGIGAGVILVAAY
IQVSFWCLAAGRQIHKIRKQFFHAIMRQEIGWFDVHDVGELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQ
SMATFFTGFIVGFTRGWLTLVILAISPVLGLSAAVWAKILSSFTDKELLAYAKAGAVAEEVLAA
IRTVIAGGGQKKELERYNKNLEEAKRIGIKKAITANISIGAAFLLIYASYALAFWYGTTLVLSGE
YSIGQVLTVFFSVLIGAFSVGQASPSIEAFANARGAAYEIFKIIDNKPSIDSYSKGKPDNIKG
NLEFRNVHFSYPSRKEVKILKGLNLKVQSGQTVALVGNSCGKSTTVQLMQRLYDPTEGMVSVDG
QDIRTINVRFLREIIGVVSQEPUVFATTIAENIRYGRENTMDEIEKAVKEANAYDFIMKLPHKF
DTLVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLDEATSALDTESEAVVQVALDKARKGRTTIVI
AHRLSTVRNADVIAGFDDGVIVEKGNHDELMKEGIYFKLVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDA
LEMSSNDSRSSLIRKRSTRRSVRGSQAQDRKLSTKEALDESIPPVSFWRIMKLNLTEWPYFVVGV
FCAIINGGLQPAFAIIFSKIIGVTRIDDPETKRQNSNLFSLLFLALGIISFITFFLQGFTFGKA
GEILTKRLRYMVFRSMLRQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQVKGAIGSRLAVITQNIANLGT
GIIISFIYGWQLTLLLAIVPIIAIAGVVEMKMLSGQALKDKKELEGSGKIATEAIENFRVVSL
TQEKFEHMYAQSILQVPRNSLRKAHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAHKLMSFEDVL
LVFSAVVFGAMAVGQVSSFAPDYAKAKISAAAHIIMIIEKTPLIDSYSTEGLMPNTLEGNVTFGEV
VFNYPTRPDIPVLQGLSLEVKKQTLALVGSSCGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLLDGKEIKRN
VQWLRAHLGIVSQEPILFDCSIAENIAYGDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHAFIESLPNKYSTKVG
DKGTQLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLDEATSALDTESEKVVQEALDKAREGRTCIVIAHRLS
TIQNADLIVVFQNGRVKEHGTHQQLLAQKGIYFSMVSQAGTKRQ

```

Figure 4-11: Séquence de 1280 acides aminés de la protéine Pgp humaine. Référence NCBI de la séquence : NM_000927.

Les zones en gris, vert et cyan correspondent aux acides aminés déduits du séquençage partiel de l'ARNm du gène MDR1 extrait des cellules MCF-7/mdr. La séquence des acides aminés en gras correspond à l'épitope reconnue par l'anticorps primaire C219, utilisé pour la détection de la Pgp en *western blot*.

4.2.2 Évaluation du trafic intracellulaire des nanoparticules chitosane-siRNA et de la délivrance cytoplasmique des siRNA

L'évaluation de la capacité des nanoparticules chitosane/MDR-siRNA à franchir la membrane plasmique et libérer les siRNA dans le cytosol des cellules MCF-7/mdr représente une étape importante pour élucider l'efficacité de transfection des nanoparticules. En effet, l'efficacité de chitosane comme un système de livraison dépend de l'équilibre subtil entre la stabilité et l'instabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La stabilité est nécessaire pour franchir la bicouche lipidique alors que l'instabilité permet une dissociation des MDR1-siRNA du chitosane, favorisant ainsi leur accès à la machinerie de l'ARN interférant des cellules MCF-7/mdr. Les nanoparticules utilisées dans le cadre cette étude ont été préparées avec des formulations de chitosane caractérisé par des MM et DDA différent. L'internalisation des nanoparticules par les cellules MCF-7/mdr a été évaluée quantitativement par cytométrie en flux et qualitativement par microscope confocal à balayage laser des cellules vivantes.

4.2.2.1 Cytométrie en flux (FACS)

La cytométrie en flux a été utilisée afin de quantifier l'internalisation des nanoparticules par les cellules MCF-7/mdr. Les nanoparticules ont été générées suite à une complexation simple et directe entre le chitosane et le siGLO, ARN double brin marqué par 6-FAM. La préparation des nanoparticules chitosane-siGLO a été effectuée avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à un ratio N : P de 5.

L'étude de l'internalisation des nanoparticules a été effectuée 24 heures après la transfection. Deux conditions de transfection ont été évaluées dans le même pH 6,5. La première condition (condition #1) consiste à transfacter les cellules en présence de 10% de FBS, tandis que la deuxième condition est caractérisée par l'ajout de FBS 5 heures après la transfection. Les données quantitatives générées par le FACS ont été présentées sous forme de pourcentage des cellules transfectées (figure 4-12) et de moyenne de la fluorescence internalisée par chaque cellule (figure 4-13). Les résultats présentés dans la figure 4-12 démontrent que le pourcentage des cellules transfectées dépend de la condition de transfection et aussi de la MM de chitosane utilisé pour la préparation des nanoparticules. En effet, le recours à la deuxième méthode de

transfection (condition #2) aboutit à une diminution significative ($P <0,01$) du pourcentage des cellules transfectées par les nanoparticules préparées avec le chitosane 92-10 et 80-10 à un ratio N : P 5. Tandis que ces dernières ont été internalisées par 100 % des cellules vingt-quatre heures après la transfaction en présence de FBS (condition #1). Néanmoins, la méthode de transfaction ne possède pas un effet sur le pourcentage des cellules transfectées par les nanoparticules à base de chitosane caractérisé par une MM élevée (92-150-5 et 82-200-5). Comparativement aux résultats générés par le DharmaFECT (contrôle positif de transfaction), ces nanoparticules ont été internalisées par 100% des cellules MCF-7/mdr vingt-quatre heures après la transfaction. Cependant, l'inefficacité des siGLO nus à franchir la membrane plasmique a été traduite par l'absence des cellules transfectées (Figure 4-12) et la diminution de la moyenne de la fluorescence ($P <0,01$) (Figure 4-13). De plus, les résultats présentés dans la figure 4-13 démontrent que la méthode de transfaction et la formulation de chitosane utilisée pour la préparation des nanoparticules ne possèdent pas un effet significatif sur la moyenne de la fluorescence internalisée par chaque cellule ($P>0,05$).

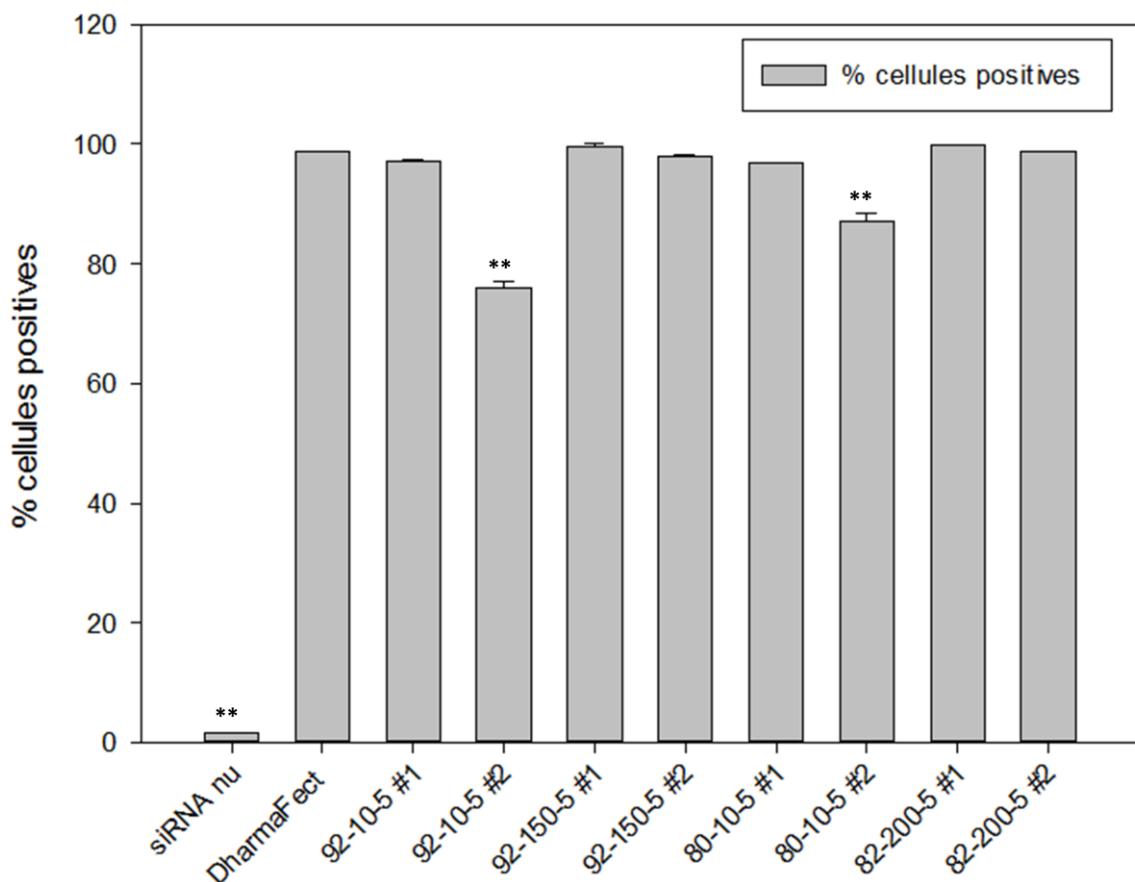


Figure 4-12: Pourcentage des cellules transfectées par les nanoparticules chitosane-siGLO préparées avec le chitosane caractérisé par MM et DDA différents ($n=2$, $p^{**}<0,01$).

La préparation des nanoparticules chitosane-siGLO a été effectuée avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à un ratio N : P de 5. L'analyse par cytométrie a été réalisée 24 heures après la transfection. Effectuées à pH 6,5, deux conditions de transfection ont été évaluées. La première condition (condition #1) consiste à transfecter les cellules en présence de 10% de FBS. Alors que la deuxième condition (condition #2) est caractérisée par l'ajout de FBS 5 heures après la transfection. Le pourcentage des cellules transfectées dépend de la condition de transfection et aussi de la MM du chitosane utilisé pour la préparation des nanoparticules.

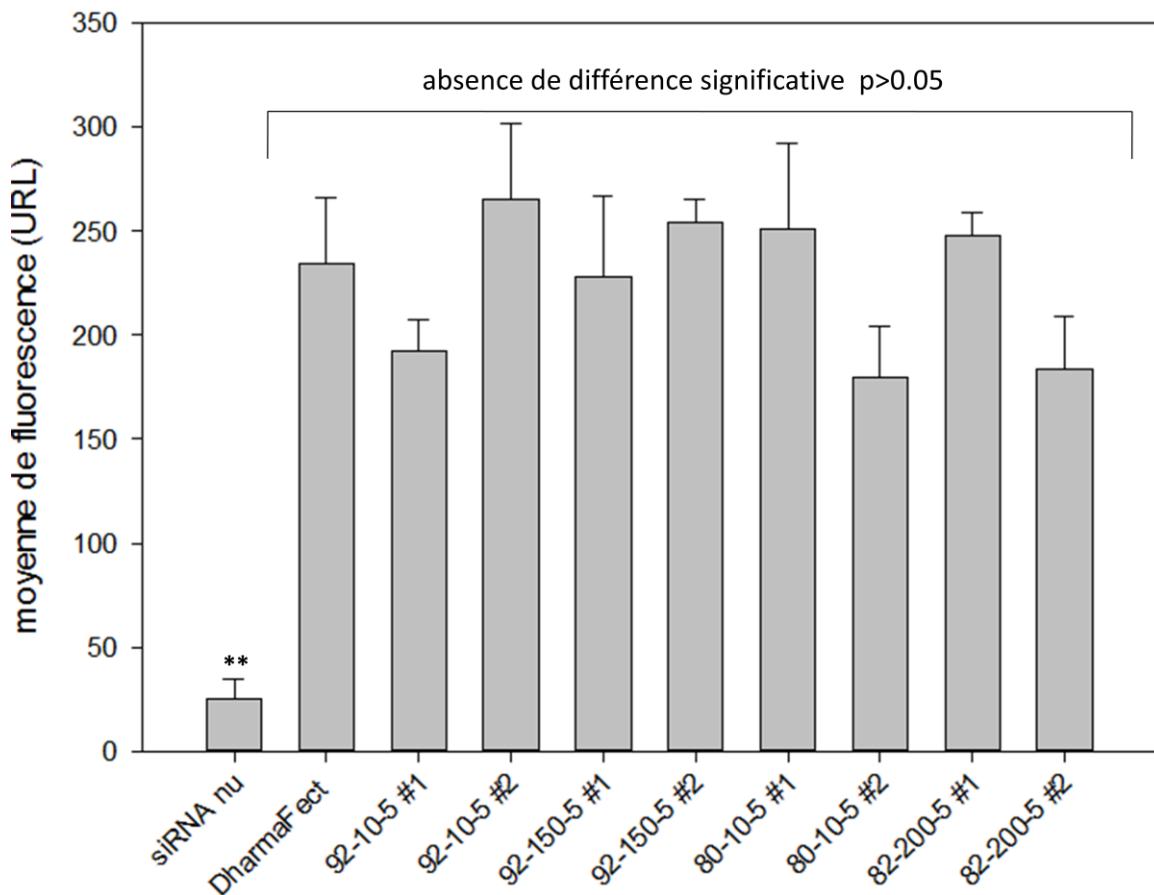


Figure 4-13: Moyenne de la fluorescence des nanoparticules chitosane-siGLO internalisées par les cellules MCF-7/mdr ($n=2$, $p^{**}<0,01$).

La préparation des nanoparticules chitosane-siGLO a été effectuée avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10, 82-200 à un ratio N : P de 5. L'analyse par cytométrie a été réalisée 24 heures après la transfection. Effectuées à pH 6.5, deux conditions de transfection ont été évaluées. La première condition (condition #1) consiste à transfacter les cellules en présence de 10% de FBS. La deuxième condition (condition #2) est caractérisée par l'ajout de FBS 5 heures après la transfection. La méthode de transfection et la formulation de chitosane utilisée pour la préparation des nanoparticules ne possèdent pas un effet significatif sur la moyenne de fluorescence internalisée par chaque cellule ($p>0,05$). URL, unité relative de lumière.

4.2.2.2 Microscopie confocale

L'imagerie par microscopie confocale des cellules vivantes fournit des données qualitatives sur l'internalisation des nanoparticules par les cellules MCF-7/mdr et leur localisation par rapport aux compartiments cellulaires. La microscopie confocale permet d'obtenir des images de fluorescence des fluorochromes présents dans les échantillons à étudier. Le fluorochrome absorbe alors l'énergie des faisceaux excitants et émet une fluorescence qui sera par la suite transformée en image numérique. La détection simultanée de plusieurs fluorescences, durant l'observation par microscopie confocale, est aussi indispensable pour appréhender la distribution des nanoparticules par rapport aux compartiments cellulaires. De ce fait, le chitosane, les siRNA et ainsi que la membrane plasmique ont été marqués par des fluorochromes différents afin de pouvoir localiser les nanoparticules et démontrer leur capacité à franchir la membrane plasmique et libérer les siRNA dans le cytosol. En effet, les nanoparticules (en jaune) ont été générées suite à une complexation simple et directe entre le chitosane marqué à la Rhodamine (en rouge) et les siGLO marqués par 6-FAM (en vert). Alors que, la membrane plasmique des cellules MCF-7/mdr (en bleu) a été marquée suite à une incubation avec *Cell MaskTM*.

L'observation par microscopie confocale a été effectuée vingt-quatre heures après la transfection. Le même profil a été obtenu chez les cellules MCF-7/mdr transfectées par les nanoparticules préparées avec le chitosane 92-10, 92-150, 80-10 à un ratio N : P de 5. Vingt-quatre heures après la transfection, les images révèlent une diffusion des siGLO (en vert) expliquée par une décomplexassions des nanoparticules dans le cytoplasme des cellules MCF-7/mdr. De plus, les images révèlent la présence des nanoparticules encore stables (en jaune) dans le cytoplasme cellulaire. Les nanoparticules sont probablement piégées dans l'endosome cellulaire. L'observation par microscopie confocale des cellules MCF-7/mdr transfectées démontre que le chitosane est capable de franchir la membrane cellulaire et libérer les siRNA dans les 24 heures suivant la transfection.

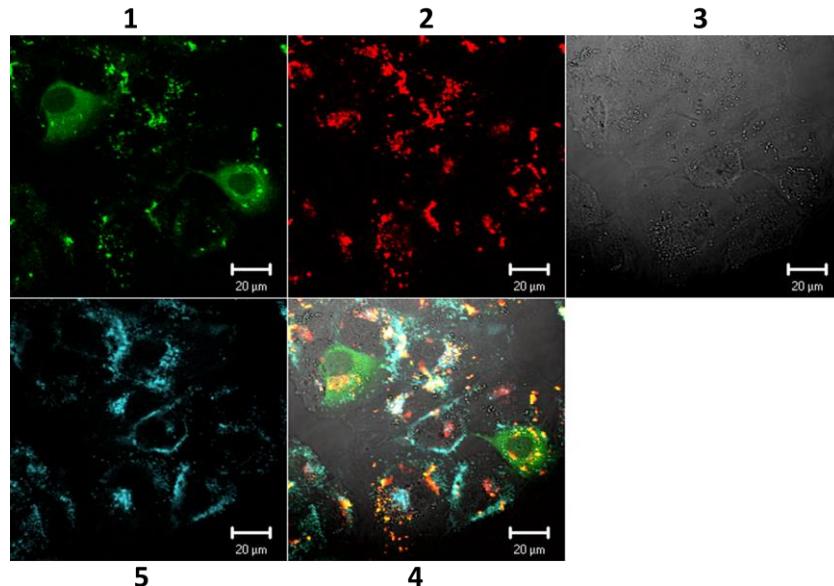
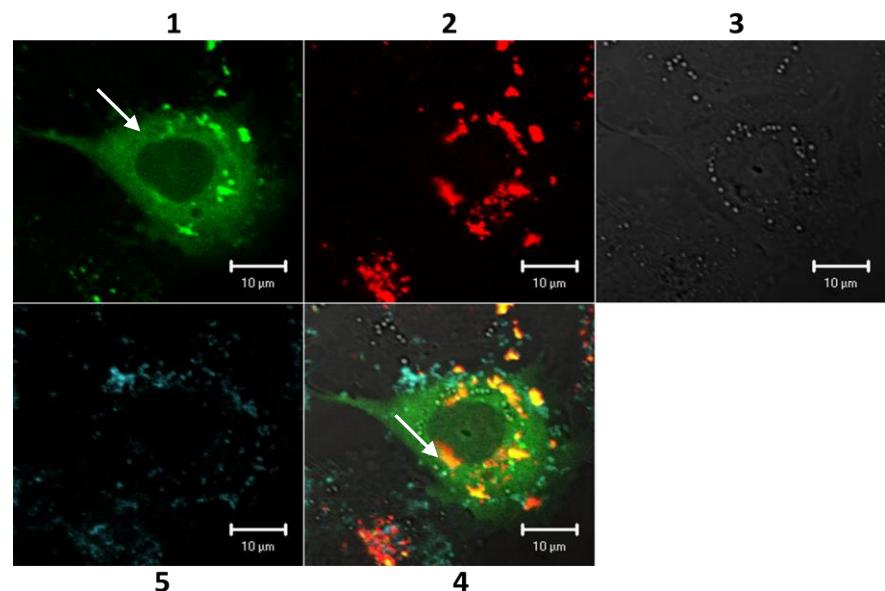
a)

Image en plan éloigné des cellules transfectées



Zoom appliqué sur une cellule transfectée

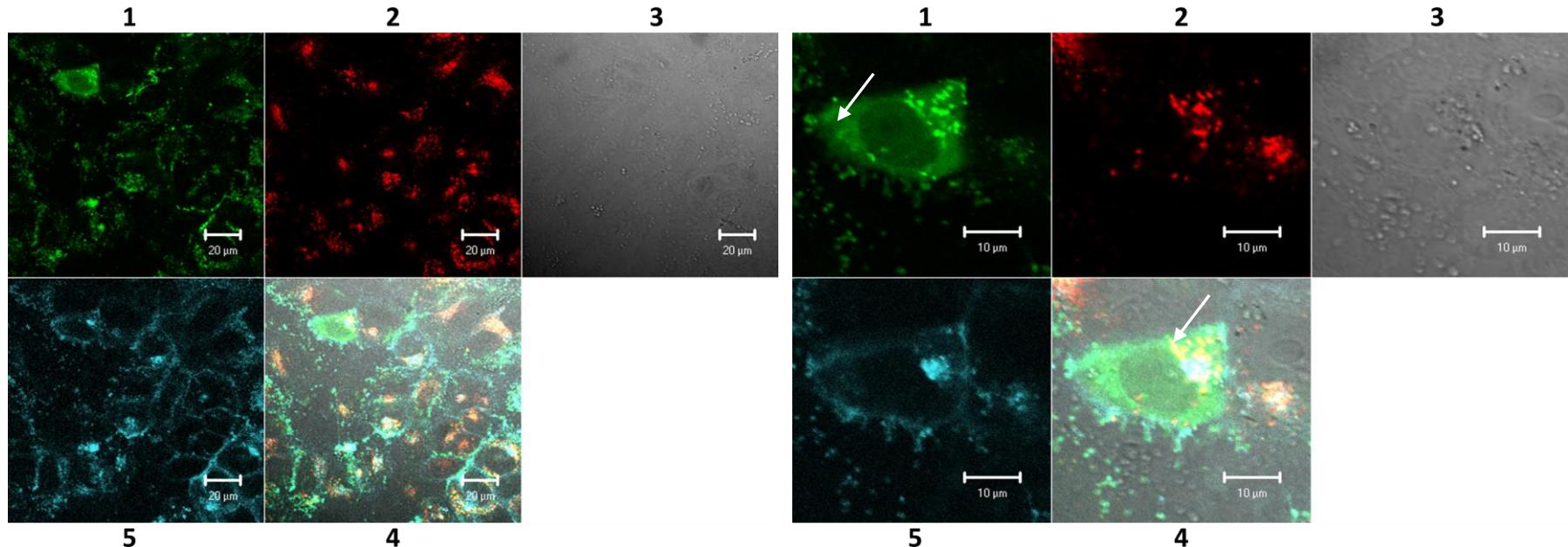
b)

Image en plan éloigné des cellules transfectées

Zoom appliqué sur une cellule transfectée

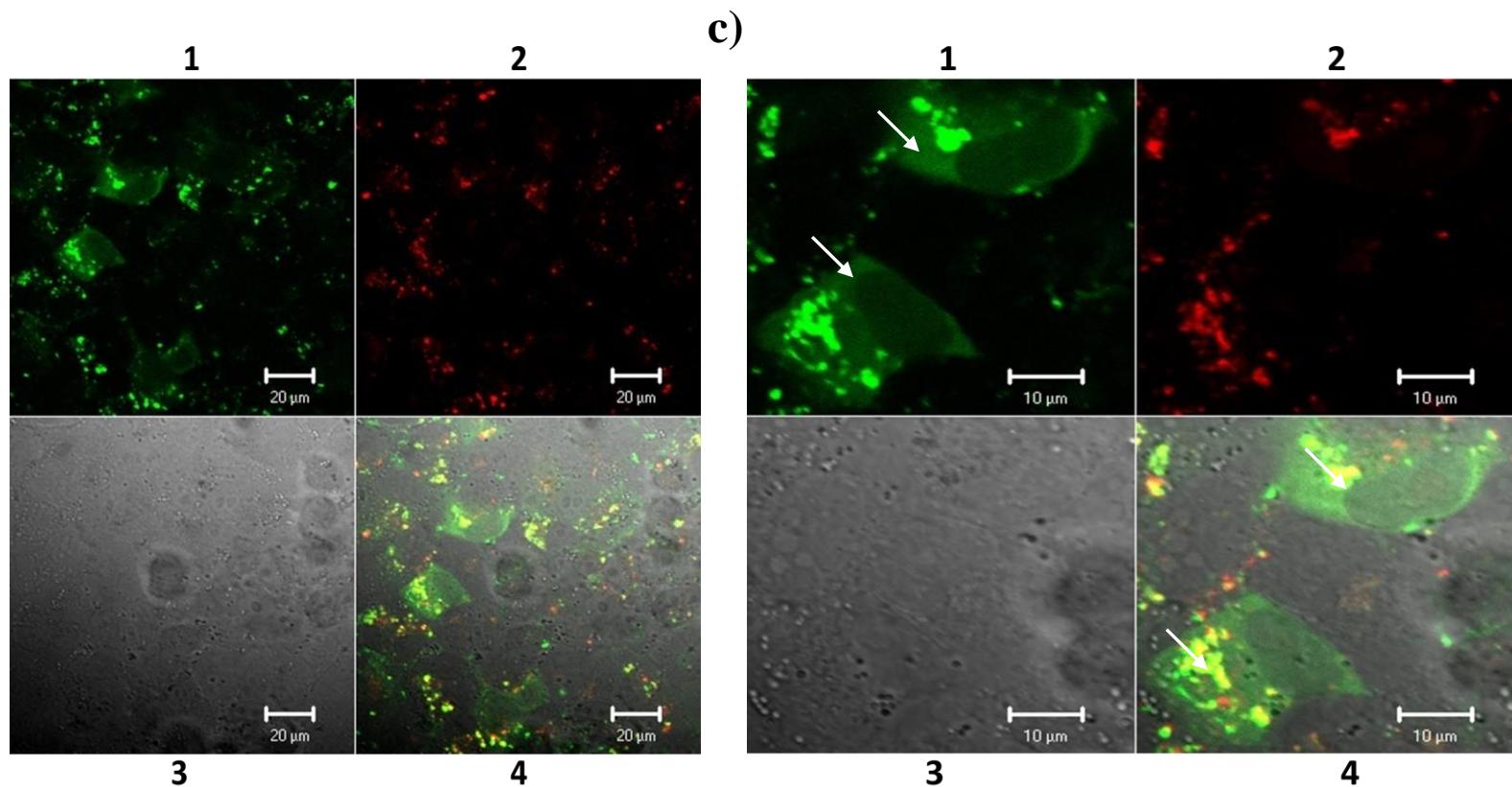


Image en plan éloigné des cellules transfectées

Zoom appliqué sur une cellule transfectée

Figure 4-14: Observation de l'internalisation des nanoparticules chitosane-siGLO et la libération des siGLO à l'intérieur des cellules MCF-7/mdr.

L'observation par microscopie confocale a été effectuée 24 heures après la transfection. Les images obtenues démontrent que les nanoparticules chitosane-siGLO préparées avec les formulations suivantes : a) 92-10-5, b) 92-150-5 et c) 80-10-5 sont capables de franchir la membrane cytoplasmique des cellules MCF-7/mdr colorée par le Cell Mask TM (visualisé en bleu, **5**). Les formulations de chitosane utilisées pour préparer les nanoparticules sont marquées par la Rhodamine (visualisé en rouge, **2**) tandis que la molécule 6-FAM est responsable des propriétés fluorescentes des siGLO (visualisé en vert, **1**). Les nanoparticules sont affichées (en jaune, **4**) suite à la superposition des signaux de la Rhodamine et 6-FAM. Les flèches pointent les nanoparticules et la libération des siGLO dans le cytoplasme. Le tapis cellulaire est aussi observé sans détection de fluorochromes (**3**).

4.2.3 Étude de la toxicité cellulaire des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA en utilisant la technique d'Alamar bleu

La toxicité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été évaluée par le test Alamar bleu. Un test qui mesure l'activité métabolique liée aux enzymes mitochondrielles qui se traduit par la réduction de l'Alamar bleu (le resazurin) en un produit fluorescent appelé resorufine. Ainsi, l'augmentation de la fluorescence révèle une activité métabolique importante témoin d'une bonne santé cellulaire et donc moins d'effet toxique associé à l'agent testé.

Le test d'Alamar bleu a été effectué 24 heures après la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Le recours à ce test permet d'évaluer la cytotoxicité associée aux nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA et la comparer au DharmaFect, commercialisé par Dharamacon comme un réactif de transfection de haute efficacité. De plus, la cytotoxicité associée au chitosane seul et siRNA non complexés au chitosane (siRNA nu) a été aussi évaluée par le test d'Alamar bleu.

Les formulations de chitosane 92-10, 80-10, 92-150 et 82-200 ont été utilisées pour la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La préparation des nanoparticules a été effectuée par une complexation simple et directe avec les MDR1-siRNA à un ratio N : P de 5, 10 et 30. La concentration des siRNA a été choisie pour aboutir à des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA renfermant 100 nM de MDR1-siRNA.

Les résultats présentés dans la figure 4-15 démontrent une absence de différences significatives du pourcentage de réduction de l'Alamar bleu entre les cellules non transfectées et les cellules transfectées par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. L'activité métabolique des cellules MCF-7/mdr n'a pas été affectée suite à la transfection par les nanoparticules, confirmant ainsi l'absence de cytotoxicité associée aux nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. De même, la transfection avec le chitosane seul et les MDR1-siRNA non complexés (siRNA nu) n'aboutit pas à une diminution du pourcentage de réduction témoignant la bonne activité métabolique des cellules MCF-7/mdr. Cependant, une diminution significative du pourcentage de réduction de l'Alamar bleu a été observée après la transfection par le DharmaFECT. Ce résultat corrobore avec les données de la littérature et confirme la cytotoxicité associée à ce système de livraison lipidique (DharmaFECT).

Les données issues du test d'Alamar bleu permettent de mettre en évidence les propriétés de chitosane comme un système livraison des siRNA non toxique. Il est important ensuite d'évaluer

le potentiel du chitosane à transporter les MDR1-siRNA et engendrer une diminution de l'expression du gène cible.

À la lumière des résultats du test Alamar bleu, les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA contenant 100 nM de siRNA ont été choisies pour évaluer ultérieurement leur potentiel de silençage génique.

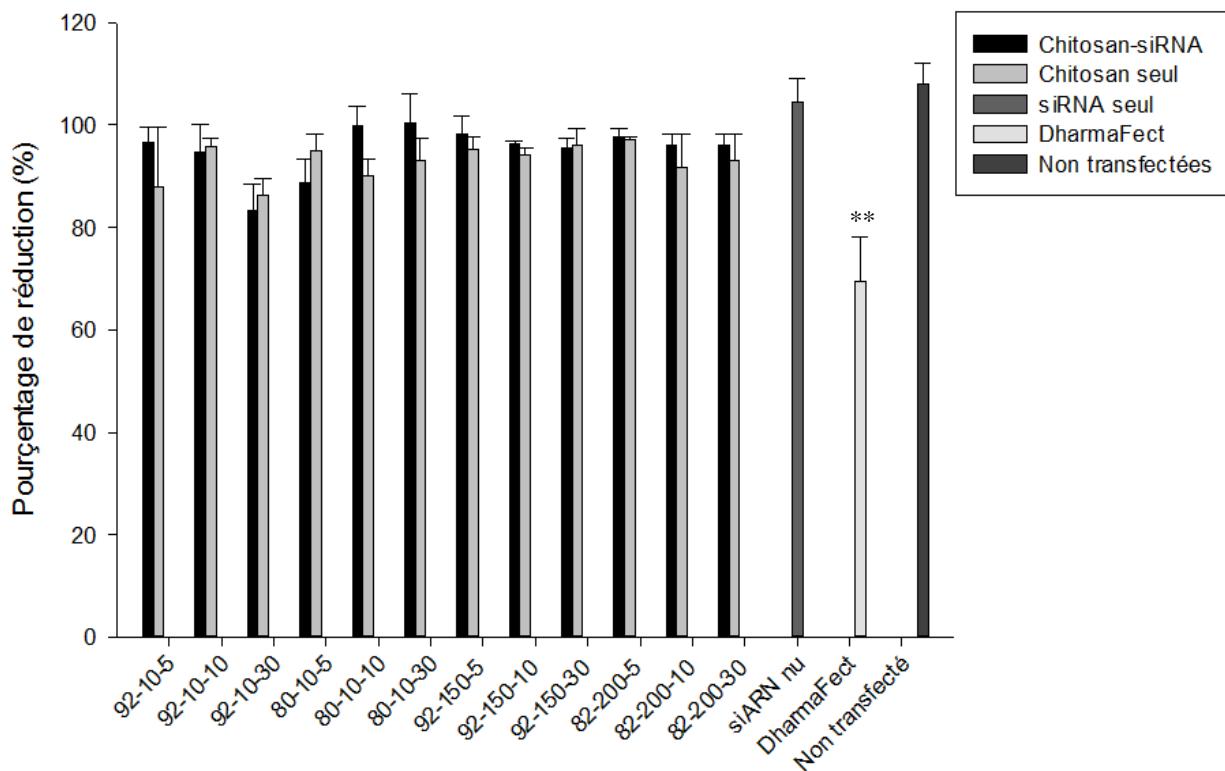


Figure 4-15 : Effet des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sur l'activité métabolique des cellules MCF-7/mdr. (n=2, p**<0,01)

Le test d'Alamar bleu a été effectué 24 heures après la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Les formulations de chitosane 92-10, 80-10, 92-150 et 82-200 ont été utilisées pour la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. La complexation avec les MDR1-siRNA a été effectuée à un ratio N : P de 5, 10 et 30. L'effet du chitosane seul et des MDR1-siRNA nus a été aussi évalué. La mesure de l'activité cellulaire est basée sur le taux d'oxydoréduction de l'Alamar bleu, composé d'un indicateur colorimétrique sensible à l'activité métabolique. Déterminé par la mesure densitométrique à 570 nm et 600 nm, le pourcentage de réduction de l'Alamar bleu reflète l'activité métabolique des cellules MCF-7/mdr.

4.2.4 Évaluation de silençage génique suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

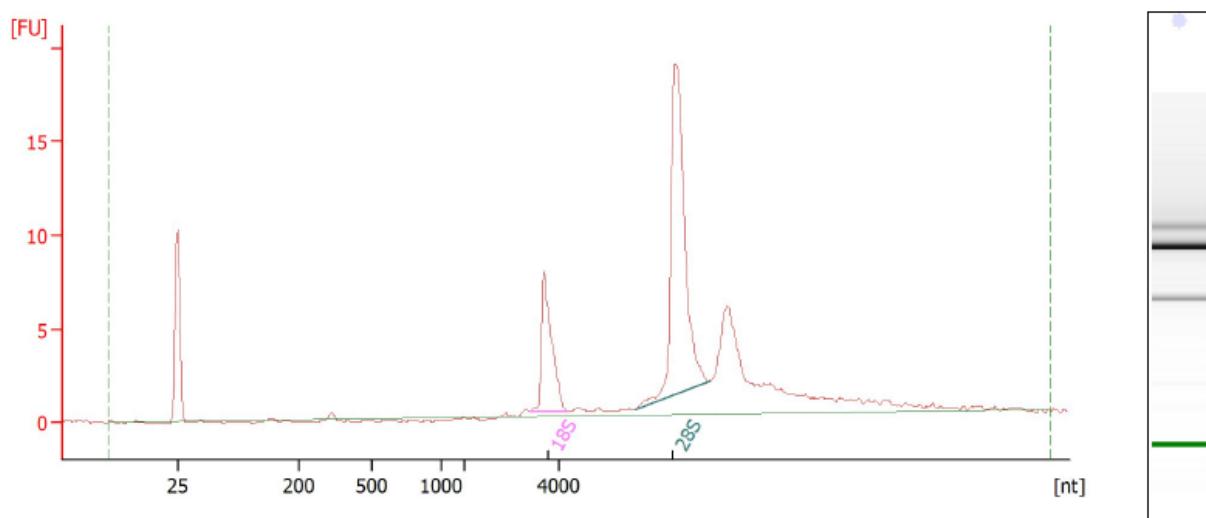
La capacité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à franchir la membrane plasmique et libérer leur cargo a été démontrée par les études de l'internalisation. Par la suite, la qRT-PCR permet de confirmer la capacité des MDR1-siRNA à reconnaître et s'hybrider à leur ARNm cibles permettant ainsi une interférence et inhibition sélective des ARNm codants pour la Pgp, protéine membranaire responsable de la résistance des cellules MCF-7/mdr aux drogues telles que la Doxorubicine.

4.2.4.1 Contrôle qualité de l'ARN total extrait à partir des cellules MCF-7/mdr transfectées par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

La qRT-PCR est la méthode de référence pour la quantification des ARNm et la mesure de niveau d'expression du gène d'intérêt (MDR1). Sensible, spécifique et reproductible, la qRT-PCR permet de détecter des faibles changements de l'expression d'un gène donné. Cependant, cette technique délicate dépend de la qualité de l'ARN. Celle-ci représente alors une source de variation et peut facilement introduire des erreurs dans la quantification des transcrits. Notamment, il est important de quantifier l'ARN de façon précise et d'évaluer son intégrité pour obtenir des résultats pertinents et réduire ainsi la variabilité expérimentale associée aux différentes étapes de la réaction. Récemment, l'analyse qualitative de l'ARN a été énormément simplifiée et améliorée grâce aux développements de système d'électrophorèse capillaire sur puce, tel que Bioanalyseur 2100 d'Agilent. Cette technique permet un contrôle qualité rapide de l'ARN avec une consommation minimale de l'échantillon. Les résultats générés par le Bioanalyseur 2100 sont présentés sous forme des bandes (comparable à celle d'un gel d'électrophorèse) et un électrophorégramme (ensemble de pics) (Figure 4-16). L'intégrité de l'ARN est alors déduite à partir du rapport entre les deux bandes de l'ARN ribosomal (28S et 18S) et le profil de l'électrophorégramme. Pour chaque échantillon le logiciel détermine le ratio 28S/18S et attribue un facteur d'intégrité RIN (*RNA integrity number*) qui tient compte de la forme de la courbe dans l'électrophorégramme. La valeur de RIN s'étend entre une échelle de 0 à 10. Un RIN de 0 correspond à une dégradation totale de l'ARN et un RIN de 10 est un ARN de très grande qualité. En effet, un ARN de bonne qualité est caractérisé par un électrophorégramme présentant des pics de fluorescence élevés d'ARN ribosomal (18S et 28S) et des bandes intactes

sur le profil de gel. Tandis qu'un échantillon dont l'ARN extrait est de mauvaise qualité présente une diminution de la fluorescence au niveau de l'électrophorégramme qui se traduit par une dégradation des bandes 28S et 18S sur le profil de gel.

L'interprétation des résultats présentés dans la figure 4-16 confirme la bonne qualité des ARN extraits et par conséquent l'efficacité de la méthode d'extraction utilisée. En effet, l'ARN des échantillons à analyser par qRT-PCR a été caractérisé par une valeur de RIN supérieur à 8. Tel que mentionné dans la littérature, les ARN caractérisés par un tel RIN permettent d'assurer la robustesse et la reproductibilité des résultats générés par la qRT-PCR (Fleige et al., 2006; Schroeder et al., 2006). Les résultats présentés dans la figure 4-16 représentent un électrophorégramme d'ARN de haute qualité ($RIN=9.4$) caractérisé par des pics de fluorescence visibles qui se traduit au niveau du profil de gel par des bandes 28S et 18S intactes.



Overall Results for sample :

RNA Area:	79.8	RNA Integrity Number (RIN):	9.7 (B.02.07)
RNA Concentration:	57 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.7	Result Flagging Label:	RIN: 9.70

Figure 4-16 : Profil d'un ARN total de haute qualité (RIN=9.7) généré par le système d'électrophorèse capillaire sur puce (Bioanalyser 2100 d'Agilent).

L'extraction de l'ARN total a été effectuée en utilisant les colonnes d'affinités. L'ARN total a été extrait à partir des cellules MCF-7/mdr transfectées par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Les résultats générés par le Bioanalyser 2100 d'Agilent sont présentés sous forme d'un électrophorégramme et des bandes comparables à celle d'un gel d'électrophorèse. Un ARN de bonne qualité est caractérisé par des bandes 18S et 28S nettement visibles sur le profil de gel. De plus, l'électrophorégramme d'un ARN de haute qualité (RIN=9.7) présente des pics de fluorescences élevées qui correspondent à l'ARN ribosomal 18S et 28S. L'intégrité de l'ARN est alors déduite à partir du rapport entre l'ARN ribosomal 28S et 18S. Le logiciel détermine le ratio 28S/18S et attribue un facteur d'intégrité RIN (*RNA integrity number*) qui tient compte de la forme de la courbe dans l'électrophorégramme.

4.2.4.2 Quantification relative par qRT-PCR du niveau de l'ARNm codant pour la Pgp

Les analyses effectuées par le Bioanalyser démontrent que les ARN extraits possèdent un RIN supérieur à 8 ce qui confirme leur bonne qualité et l'efficacité de la méthode d'extraction. Sur la base de ces analyses, une réaction de transcription inverse a été effectuée suivie d'une PCR quantitative (PCR en temps réel).

4.2.4.2.1 Évaluation de l'efficacité des MDR1-siRNA à silençer le gène MDR1

La q-PCR a été réalisé en premier lieu pour évaluer le pouvoir de silençage des siGENOME SMART pool (MDR1-siRNA) utilisés pour la première fois dans notre laboratoire et aussi de comparer le niveau d'expression de l'ARNm codant la Pgp dans les deux lignées cellulaires (MCF-7/mdr et MCF-7 sensibles). Le DharmaFECT, un réactif de transfection de haute efficacité, a été utilisé pour assurer une livraison efficace des siGENOME SMART pool et évaluer ainsi leur capacité à inhiber spécifiquement l'expression du gène MDR1.

Les résultats présentés dans la figure 4-17 corroborent avec les données de la littérature (Akhtar et al., 2011) et démontrent que la lignée MCF-7 sensible est caractérisée par un faible niveau d'ARNm codant pour la Pgp, responsable de la chimiorésistance. De plus, un silençage du gène MDR1 a été observé suite à la transfection avec siGENOME SMART pool. Les résultats démontrent que la diminution de l'ARNm dépend de la concentration des MDR1-siRNA utilisée. En effet, la transfection avec 100nM aboutit à un meilleur silençage génique avec 95% de diminution de l'ARNm du gène MDR1. Évaluée non cytotoxique (Figure 4-15), cette concentration a été utilisée pour la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA afin d'assurer un pouvoir de silençage élevé.

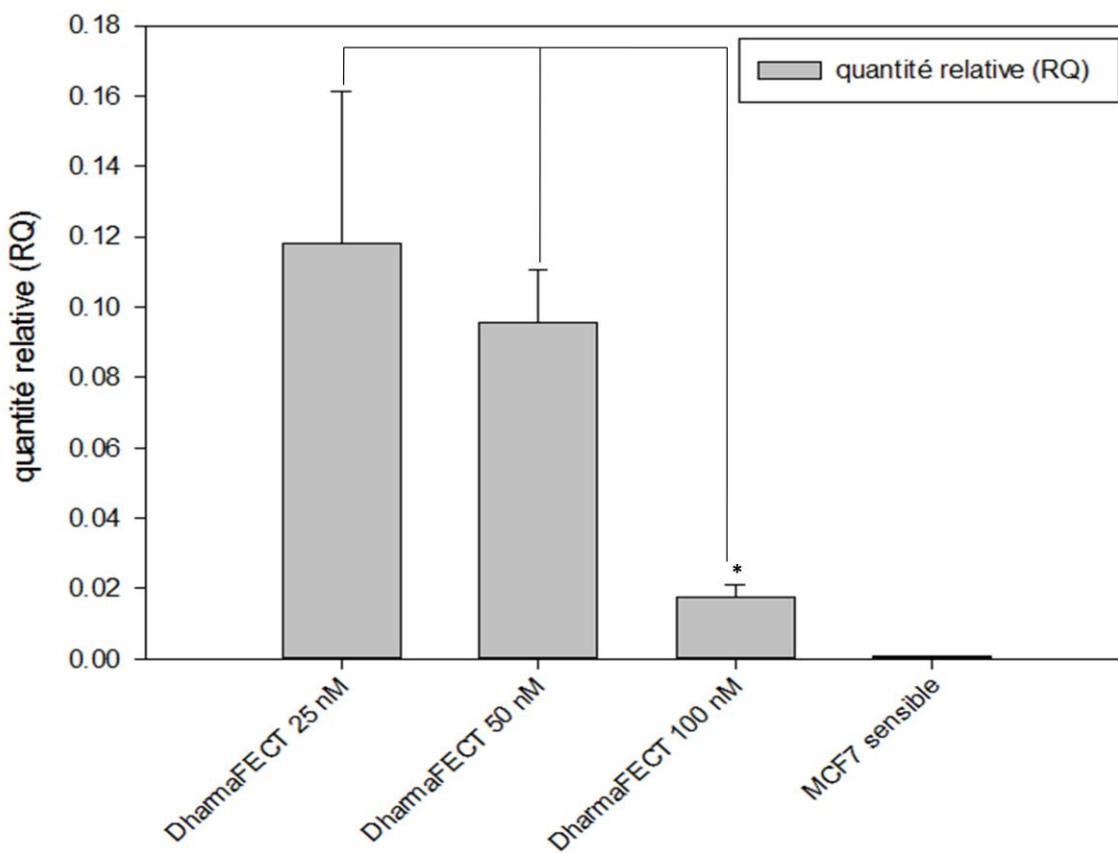


Figure 4-17: Quantification relative du niveau de l'expression de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr transfectées par DharmaFECT/MDR1-siRNA et les cellules MCF-7 sensibles ($n=2$, $p^*<0,05$).

siGENOME SMART pool représente une combinaison de 4 duplex de MDR1-siRNA ciblant des régions différentes de l'ARNm (4718 pb) codant pour la Pgp. Utilisé pour la première fois dans notre laboratoire, il est important d'évaluer son efficacité à inhiber l'expression de la Pgp. Le recours au DharmaFect permet d'assurer une livraison efficace des siGENOME SMART pool dans les cellules MCF-7/mdr. La réaction de qRT-PCR a été effectuée 24 heures après la transfection suite à une extraction de l'ARN des cellules. La quantité relative de l'ARNm du gène MDR1 a été estimée par le cycle seuil C_t avec le recours à la méthode $\Delta\Delta C_t$. La valeur C_t du gène MDR1 a été normalisée au gène endogène GAPDH et comparée avec les cellules MCF-7/mdr non transfectées (calibrateur). Les résultats montrent que la lignée MCF-7 sensible présente un faible niveau d'ARNm du gène MDR1. Le silençage de l'ARNm du gène MDR1 dépend de la concentration des siGENOME SMART pool utilisée.

4.2.4.2.2 Évaluation du silençage génique par qRT-PCR suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

Suite à l'évaluation de l'efficacité de siGENOME SMART pool, il est important mettre en évidence la capacité de chitosane à assurer leur livraison au sein des cellules MCF-7/mdr. De ce fait, une réaction qPCR a été effectuée suite à la transfection des cellules MCF-7/mdr par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Les nanoparticules ont été préparées par complexation simple et directe des MDR1-siRNA avec le chitosane 92-10 et 92-150 à un ratio N : P de 5. Deux conditions de transfection ont été évaluées. La première condition (condition #1) consiste à transfacter les cellules MCF-7/mdr en présence de 10% de FBS, tandis que la deuxième condition est caractérisée par l'ajout de FBS 5 heures après la transfection.

Les résultats de la q-PCR présentés dans la figure 4-18 démontrent un silençage de l'ARNm codant pour la Pgp. Le silençage observé dépend de la MM du chitosane et aussi de la méthode de transfection (condition #1 et condition #2). Comparativement à la condition #1, l'ajout de FBS 5 heures après la transfection (condition#2) aboutit à une amélioration significative du taux de silençage ($P<0,01$) suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. L'amélioration du silençage a été observée suite à la transfection par les nanoparticules préparées avec de chitosane 92-10 et 92-150 à un ratio N : P de 5.

De plus, les résultats révèlent que la transfection par les nanoparticules à base de chitosane caractérisé par une masse moléculaire élevée (92-150-5) induit un taux de silençage comparable au contrôle positif (DharmaFECT).

Tel que mentionné dans les travaux de Fedorov, le système de livraisons cationique peut induire un effet de silençage non spécifique expliqué par le changement de profil d'expression de plusieurs gènes (Fedorov et al., 2005). De ce fait, un contrôle négatif a été introduit afin de vérifier le profil d'expression du gène MDR1 suite à la transfection avec le chitosane seul (1,89 µg). Les résultats démontrent que la transfection avec 1,89 µg du chitosane seul (CS) ne possède pas un effet significatif sur le taux d'expression du gène MDR1. Ces résultats démontrent que le chitosane n'interfère pas avec l'expression du gène MDR1 confirmant ainsi la spécificité du silençage obtenue. Décris pour la première fois en 2003, les effets de silençage non spécifiques dépendent aussi de la concentration des siRNA utilisés (Jackson et al., 2003). Ainsi, il est important d'évaluer l'effet de la concentration 100 nM sur le profil d'expression du gène MDR1. De ce fait, un contrôle incluant une transfection avec 100 nM de *siGENOME Non-Targeting*

Control Pools a été introduit durant la réaction de la q-PCR. Ce réactif, développé par Dharmacon, est constitué de 4 séquences de siRNA ciblant aléatoirement des gènes humains, de souris et de rat.

La transfection avec 100 nM de *siGENOME Non-Targeting Control Pools* n'induit pas un silençage significatif de l'ARNm codant pour la Pgp, protéine responsable de la chimiorésistance. Les résultats confirment la spécificité du silençage obtenue étant donné que la transfection avec le chitosane seul et aussi avec *siGENOME Non-Targeting Control Pools* n'aboutit pas à une diminution significative de l'ARNm codant pour la Pgp.

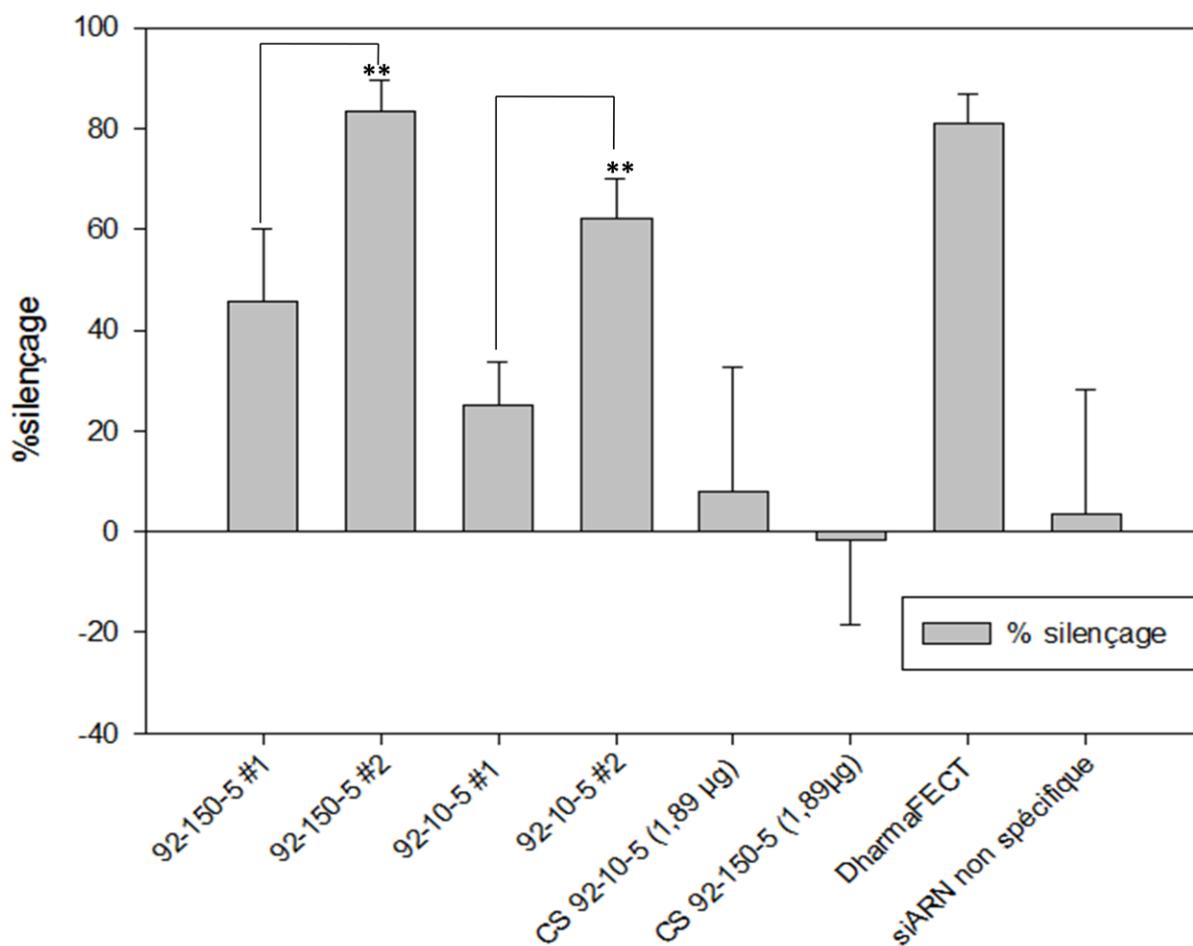


Figure 4-18: Niveau de silençage génique du gène MDR1 suite à la transfection avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ($n=2$, $p^{**}<0,01$).

La préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été effectuée avec le chitosane 92-10, 92-150, un ratio N : P de 5. L'analyse par qRT-PCR a été réalisée 24 heures après la transfection. Deux conditions de transfection ont été évaluées. La première condition (condition #1) consiste à transfacter les cellules en présence de 10% de FBS. Alors que la deuxième condition (condition #2) est caractérisée par l'ajout de FBS 5 heures après la transfection. Le niveau de silençage a été déterminé en comparant la quantité relative de l'ARNm (MDR1) des cellules MCF-7/mdr non transfectées (attribuée à 100%) avec la quantité relative des cellules transfectées.

4.2.5 Étude phénotypique du silençage génique de la protéine cible (Pgp)

Les résultats de la qPCR démontrent que les MDR1-siRNA transportés par le chitosane conduit à une dégradation spécifique de l'ARNm du gène MDR1. Confirmé au niveau transcriptomique, il est important d'évaluer le silençage génique sur le plan phénotypique et prouver ainsi l'effet des MDR1-siRNA sur la traduction et la synthèse de la Pgp, responsable de la chimiorésistance.

Permettant la détection spécifique des protéines, le *Western blot* a été utilisé pour mettre en évidence le taux d'expression de la Pgp suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Fixant un épitope spécifique de la Pgp, l'anticorps primaire monoclonal d'origine murin (C219) a été exposé un anticorps secondaire polyclonal anti-souris. Ce dernier couplé à une enzyme (horseradish peroxidase) catalyse une réaction de chimiluminescence dont le produit émet une luminescence proportionnelle à la concentration de la Pgp. Ainsi, le signal lumineux émis apparaît sur le film photographique sous forme de bande dont l'intensité dépend de la quantité de la Pgp .

L'analyse par *Western blot* a été effectuée 48 heures après la transfection des cellules MCF-7/mdr par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Les nanoparticules ont été générées suite à une complexation simple et directe entre les MDR1-siRNA et le chitosane à un ratio N : P de 5. Les deux formulations de chitosane 92-10 et 92-150 ont été utilisées pour la préparation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Deux conditions de transfection ont été évaluées. La première condition (condition #1) consiste à transfacter les cellules MCF-7/mdr en présence de 10% de FBS, tandis que la deuxième condition est caractérisée par l'ajout de FBS 5 heures après la transfection. Les résultats sont présentés sous forme d'une image d'un film photographique dont l'intensité des bandes a été quantifiée et traduite en fluorescence relative.

Les résultats obtenus supportent les données générées par la qPCR. En effet, les MDR1-siRNA transportés par le chitosane assure une dégradation spécifique de l'ARNm cible empêchant ainsi la traduction et la synthèse de la Pgp. Les résultats démontrent que le potentiel du chitosane comme un système de livraison des siRNA dépend de sa masse moléculaire et aussi de la condition de transfection. Comparativement à la condition #1, le FBS ajouté 5 heures après la transfection améliore significativement la livraison des siRNA dans les cellules MCF-7/mdr. De

plus, la livraison des siRNA dépend aussi de la masse moléculaire de chitosane. Caractérisé par une masse moléculaire plus élevée, le chitosane 92-150 complexé avec les MDR1-siRNA à un ratio N:P de 5 assure une livraison efficace des siRNA. Ceux-ci abouti un silençage génique plus élevé qui se traduit par une inhibition de la traduction et par conséquent une baisse de l'expression de la Pgp expliquée par une diminution de l'intensité des bandes dans les puits 3 et 4. Il est important de noter que l'intensité de bande dans le puits 3 est comparable à celle observée dans le puits 5, contrôle positif de transfection (DharmaFECT). De plus, le recours à condition #2 de transfection améliore l'efficacité de chitosane 92-150 à transporter les MDR1-siRNA, capable d'aboutir une dégradation spécifique de l'ARNm et induire par la suite un changement phénotypique des cellules résistantes (diminution importante de la Pgp) confirmé par l'absence des bandes spécifiques de la Pgp au niveau du puits 4.

Comparativement aux cellules sensibles (MCF-7 sensible), les cellules MCF-7/mdr sont caractérisées par une surexpression de la Pgp, protéine membranaire responsable de la résistance. La différence de profil observée au niveau de puits 6 et 7 confirme ces changements phénotypiques entre les deux lignées cellulaires. En effet, la surexpression de la Pgp par les cellules résistante (MCF-7/mdr) se traduit par une augmentation de l'intensité de bande dans le puits 7. Tandis que le puits 6, qui correspond aux cellules sensibles, est caractérisé par une absence de bande spécifique de la Pgp.

De plus, l'expression de la β -actine a été évaluée afin de mettre en évidence le fonctionnement du mécanisme de transcription et de traduction. Les résultats démontrent l'existence des bandes spécifique au β -actine dans tous les puits (Figure 4-19) ce qui confirme le fonctionnement de la machinerie cellulaire responsable de la transcription, traduction et la synthèse des protéines.

Les résultats démontrent aussi que la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA n'affecte pas le taux d'expression de la β -actine confirmant ainsi la spécificité du silençage de la Pgp. En effet, les MDR1-siRNA sont capables d'induire une dégradation spécifique l'ARNm empêchant la traduction et la synthèse de la protéine cible (Pgp), responsable de la chimiorésistance.

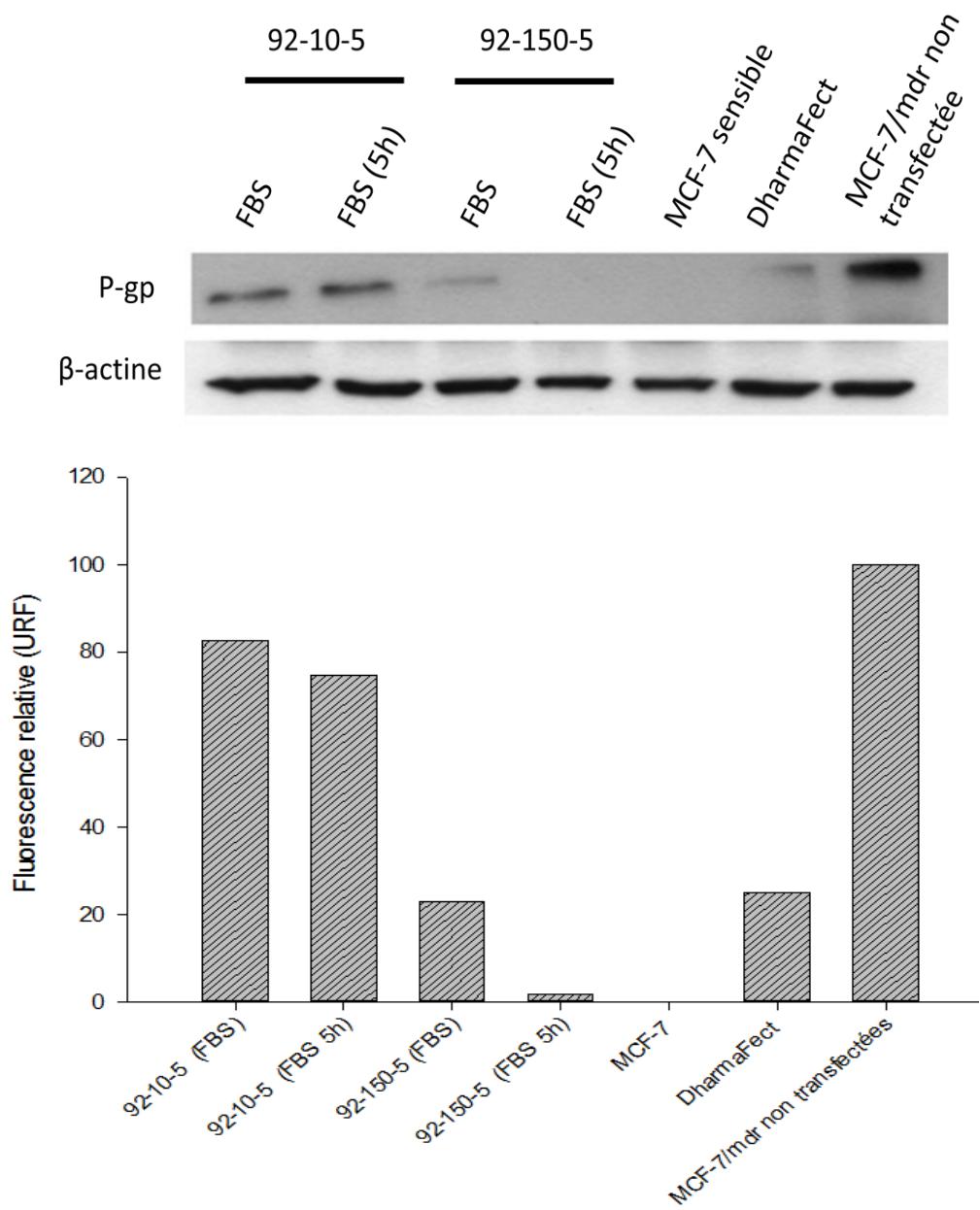


Figure 4-19: Analyse de l'expression de la Pgp par *Western blot* suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR-siRNA.

Les nanoparticules ont été préparées avec le chitosane 92-10, 92-150 à un ratio N : P de 5. L'analyse par *Western blot* a été effectuée 48 heures après la transfection. La première condition (condition #1) consiste à transfacter les cellules en présence de 10% de FBS. Alors que la

deuxième condition (condition #2) est caractérisée par l'ajout de FBS 5 heures après la transfection. Une quantité égale de protéine a été séparée sur un gel SDS-PAGE de 12% puis transférée sur une membrane de PVDF. La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire monoclonal spécifique de la Pgp (C219) et β -actine. La révélation de la Pgp a été effectuée en utilisant la détection améliorée par chimiluminescence (ECL) avec le recours à un anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxidase. Le taux d'expression de la Pgp a été quantifié par le logiciel *Image Studio Lite 4.0* en normalisant avec l'intensité du signal des cellules MCF-7/mdr non transfectées (attribuée à 100%). URF, unité de relative de fluorescence.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Le chitosane, un polymère cationique biodégradable, est utilisé dans ce cadre de projet comme un système de livraison des siRNA pour dégrader spécifiquement l'ARNm du gène MDR1 et inhiber l'expression de la Pgp, protéine responsable de la chimiorésistance.

La caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA représente la première partie de ce projet de recherche. Cette étape permet d'évaluer, en plus de la taille et la charge, la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à différents pH. Ces données facilitent le choix de la formulation de chitosane susceptible de générer des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA capables de transfecter les cellules MCF-7/mdr et libérer les MDR1-siRNA. Une fois dans le cytosol cellulaire, les MDR1-siRNA sont capables d'interférer avec l'ARNm cible et induire un effet de silençage génique qui a été évalué au niveau transcriptomique (par q-PCR) et confirmé au niveau phénotypique (par *Western blot*).

5.1 Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA

La caractérisation physicochimique a été effectuée afin d'élucider l'effet des paramètres physicochimiques du chitosane sur la taille, la charge, la stabilité et l'efficacité de transfection des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. L'analyse de la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA a été réalisée en utilisant deux méthodes distinctes. La migration des nanoparticules sur gel de polyacrylamide représente l'expérience de choix dans notre laboratoire pour évaluer la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Cependant, cette expérience fournit des données qualitatives et nécessite une grande concentration des siRNA ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). D'où le recours à la liaison compétitive des siRNA aux *RiboGreen* comme une méthode alternative. En effet, le *RiboGreen* permet la détection d'une concentration d'ARN aussi peu que $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (Jones, L. J. et al., 1998). Cette stratégie requiert alors une concentration de siRNA plus faible que la migration sur gel de polyacrylamide. De plus, le test de *RiboGreen* fournit des données qualitatives et permet l'analyse de plusieurs formulations de chitosane en moins de temps. L'interprétation des résultats de la stabilité du test *RiboGreen* confirme celle de la retardation sur gel de polyacrylamide. À la fois économique et sensible, ce test serait le choix idéal pour évaluer la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à différents pH et à plusieurs temps d'incubation. Ces résultats démontrent que la stabilité des nanoparticules

chitosane/MDR1-siRNA dépend des caractéristiques physicochimiques du chitosane. Aussi, la stabilité a été affectée par le pH de milieu dispersant qui agit sur l'efficacité de liaison entre les siRNA et le chitosane. À un pH acide (pH 6,5), les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sont qualifiées de stables à partir d'un ratio N : P de 2 et quelques soit le DDA et la masse moléculaire du chitosane utilisé. Les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA incubées à pH 6,5 sont stables pendant 20 heures d'incubation à température ambiante. Suite à son incubation dans un pH équivalent à son pKa (environ 6,5), le chitosane présente une densité de charge élevée à cause de la protonation de ses groupements amines. La protonation induit une répulsion électrostatique entre les groupements amines provoquant la flexibilité des chaînes de chitosane. Cette conformation flexible adoptée par le chitosane favorise le contact avec les MDR1-siRNA dont la charge négative favorise leur interaction avec le chitosane et la formation des nanoparticules sphériques, stables et compactes. En contraste, une augmentation du pH engendre une déprotonation des groupements amines ce qui induit par conséquent un changement conformationnel du chitosane à cause de l'effondrement électrostatique entre les groupes amines. La diminution de densité de charge entraîne aussi moins d'interaction avec les siRNA ce qui en résulte la décomplexation des nanoparticules et la libération des siRNA suite à leur incubation à un pH élevé (pH 7 et 8). Les résultats de stabilité à pH 8, démontrent que les nanoparticules formées avec du chitosane caractérisé par une faible masse moléculaire 10 kDa et un ratio N:P inférieur à 10 sont instables et libèrent les siRNA au bout de 30 minutes d'incubation à pH 8. L'augmentation de la masse moléculaire, le ratio N : P et le DDA améliore la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA dans les conditions basiques. À pH physiologique les nanoparticules sont relativement stables et une libération partielle des MDR1-siRNA a été observée sur le gel de polyacrylamide. La spectroscopie de force effectuée par Sailong Xu et al afin de mesurer l'interaction entre le chitosane et les siRNA à différent pH (4,1 , 6,1 , 7,4 et 9,5) confirment les interprétations issues ces études de stabilité (Xu, S. et al., 2007). D'autre part, les résultats de stabilité sont concomitants avec les études antérieures effectuées dans notre laboratoire. Durant ces études, les nanoparticules incubées à pH 6,5 sont stables à partir d'un ratio N : P supérieur à 2. De même, les nanoparticules incubées à pH 8 sont instables. La décomplexation des nanoparticules et la migration des siRNA sur gel de polyacrylamide a été observé dans les 30 minutes suivant l'incubation dans le milieu alcalin. Cependant, l'excès du chitosane dans le ratio N : P de 10 améliore la stabilité des nanoparticules incubées dans le même

pH malgré la déprotonation des groupements amines (Alameh et al., 2012; Jean, Myriam et al., 2012). En conclusion, le recours à la technique du mélange direct de la solution du chitosane avec les MDR1-siRNA aboutit à la formation des nanoparticules, dont la stabilité dépend du pH et des caractéristiques physicochimiques du chitosane. La stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA représente un atout majeur pour franchir les barrières cellulaires et protéger les MDR1-siRNA de l'action lytique des nucléases. Une fois dans le cytosol des cellules cibles, la décomplexation des nanoparticules est cependant nécessaire pour assurer la libération des siRNA et leur interaction avec le système de l'ARN interférence. Il est important de considérer alors un équilibre entre la protection et la libération des siRNA lors de la conception des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Les analyses par ESEM révèlent que les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA possèdent généralement une forme sphérique. Ces interprétations s'accordent avec des études précédentes effectuées avec l'ADN plasmidique (pDNA) (Jean, M et al., 2009), siRNA (Howard et al., 2006) et ODНdb (Jean, Myriam et al., 2012). L'effet de la morphologie des nanoparticules sur l'efficacité de transfections a été expliqué par B. Devika et al. Ses travaux démontrent que 100% des nanoparticules sphériques sont internalisées par les cellules comparativement aux nanoparticules en forme de tige (Verma, A. & Stellacci, 2010) qui requièrent plus de temps et de force thermodynamique pour assurer leur emballage dans des vésicules membranaires (Chithrani & Chan, 2007). Des études antérieures ont déjà montré que la masse moléculaire et le ratio N : P influencent largement la morphologie des nanoparticules chitosane-pDNA. La variation de ces paramètres aboutit à la formation des nanoparticules ayant des conformations sphériques ou toriques ou globulaires (Köping-Höggård, Mel'nikova, Vårum, Lindman, & Artursson, 2003; Liu, W. et al., 2005). De même, certaines études rapportent aussi que les nanoparticules chitosane-siRNA possèdent généralement une forme sphérique (Howard et al., 2006; Mittnacht et al., 2010) mais la masse moléculaire élevée du chitosane aboutit à l'augmentation de la proportion des nanoparticules caractérisées par une forme de tige irrégulière (Holzerny et al., 2012). Ces résultats expliquent la différence morphologique observée entre les nanoparticules préparées avec le chitosane ayant une masse moléculaire de 10 kDa (92-10-5 et 80-10-5) et celles formées avec les formulations 92-150-5 et 82-200-5 dont les images montrent la présence des nanoparticules caractérisées par des formes irrégulières allongées. Ces formes sont probablement dues aux chaînes de chitosane non complexé émanant de la surface des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. En plus de la morphologie, les analyses de l'ESEM

fournissent aussi des données concernant la taille des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Les images démontrent que les nanoparticules possèdent une taille nanométrique qui varie de 50 nm à 200 nm selon la masse moléculaire du chitosane utilisé. Ces spéculations de taille sont en corrélation avec les données de DLS. Cependant, les analyses de DLS démontrent que la taille rapportée par ESEM est généralement plus petite. Certains auteurs ont trouvé également une divergence entre la taille mesurée par DLS et celle analysée par microscopie électronique à transmission (MET). La taille des nanoparticules mesurée par MET représente à peu près la moitié des valeurs obtenues par DLS (Lou, Peng, Chen, Wang, & Leong, 2009). Cette différence de taille est peut-être due aux transformations subies par les nanoparticules durant les préparations exigées par chaque méthode. Durant les analyses par DLS les nanoparticules se trouvent en solution dans un état complètement hydraté tant que la caractérisation par ESEM requiert leur pulvérisation sur un support de silicium qui a été séché par la suite pendant 30 minutes et enrobé par une couche d'or.

Les résultats de la DLS sont affichés en *Z-average*. Ce paramètre représente la valeur moyenne du diamètre hydrodynamique des nanoparticules. Les analyses montrent que les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA possèdent une taille comprise entre 80 nm et 230 nm. Ce spectre de taille favorise l'internalisation cellulaire, une circulation sanguine prolongée et la diffusion tissulaire. Grâce à leur taille nanométrique, les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sont capables de franchir le système des phagocytes mononucléés (Guy, Drabek, & Antoniou, 1995; Huang, Khor, & Lim, 2004; Seymour, 1991). Les résultats démontrent un effet apparent de la masse moléculaire du chitosane sur la taille des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Pour le même ratio N:P de 5, la taille augmente de 83 nm pour les nanoparticules préparées avec le chitosane 92-10 à 138 nm suite à la complexation avec le chitosane 92-150. Ces résultats s'accordent avec les données de plusieurs études. Mumper et MacLaughlin ont trouvé que la taille des nanoparticules chitosane-pDNA augmente de 100 nm à 500 nm avec la variation de la masse moléculaire du chitosane. Cet effet de la masse moléculaire est expliqué par la réduction de la solubilité et la mobilité causée par la longueur de chaîne du chitosane aboutissant à une agrégation des nanoparticules durant la caractérisation de la taille (MacLaughlin et al., 1998; Mumper, RJ, Wang, J, Claspe, JM, & Rolland, AP, 1995). Plusieurs autres études démontrent l'influence de la masse moléculaire sur la taille des nanoparticules. Les travaux de Koping-Hoggard et al montrent que l'augmentation de la masse moléculaire de 2 à 7 kDa avec un même

ratio N : P 60 induit une variation de la taille des nanoparticules de 68 nm à 174 nm. D'autre part, certaines études rapportent que la masse moléculaire élevée du chitosane n'a pas un effet apparent sur la taille des nanoparticules (Romøren, Pedersen, Smistad, Evensen, & Thu, 2003). En revanche, Huang et al, ont noté une diminution de la taille des nanoparticules suite à une augmentation de la masse moléculaire du chitosane utilisé (Huang, Fong, Khor, & Lim, 2005). Ces résultats contradictoires pourraient être dus à la méthode adaptée par ces chercheurs pour préparer les nanoparticules. Ainsi, durant les travaux de Huang et al les nanoparticules ont été préparées dans le tampon HBSS-MES (pH 6,2) (Huang et al., 2005) caractérisé par une force ionique assez élevée comparativement à l'eau qui est utilisée pour préparer les nanoparticules dans cette étude.

Seules quelques études signalent l'influence de la masse moléculaire du chitosane sur la taille des nanoparticules chitosane-siRNA. Les travaux de Malmo et al (Malmo, Sørgård, Vårum, & Strand, 2012), Holzerny et al (Holzerny et al., 2012) et Alameh et al, (Alameh et al., 2012) démontrent une augmentation de la taille des nanoparticules avec l'accroissement de la masse moléculaire du chitosane utilisé tandis que Mittnacht et al. ont trouvé l'inverse de ces observations (Mittnacht et al., 2010). D'autre part, les travaux de Liu et al, ne démontrent aucune influence de la masse moléculaire sur la taille des nanoparticules chitosane-siRNA à l'exception de la formulation de chitosane possédant une masse moléculaire de 9 kDa. Cette dernière aboutit à la formation des nanoparticules caractérisées par une taille micrométrique (Liu, X. et al., 2007). Cela peut s'expliquer par l'existence des courtes chaînes de chitosane limitant la condensation des siRNA dans des nanoparticules compactes.

Les analyses de DLS ne soulignent aucune influence du DDA et du ratio N : P sur la taille des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Ces résultats s'accordent avec l'étude comparative effectuée par Alameh et al. La caractérisation de la taille par DLS a démontré que les nanoparticules complexées avec les formulations 92-10-5 et 80-10-10 ne présentent pas de différence au niveau de la taille (Alameh et al., 2012). Contrairement à ces observations, Haword et al ont noté que la taille des nanoparticules chitosane-siRNA a augmenté de 181.6 nm à 223.6 nm suite à la diminution du ratio N : P de chitosane (114 Kda) de 71 à 6. Ce résultat est dû probablement à la variation de la concentration du chitosane par rapport aux siRNA durant la préparation des nanoparticules. Néanmoins, Malmo et al, ont noté que l'augmentation du ratio N : P de 10 à 60 aboutit à un accroissement de la taille des nanoparticules chitosane-siRNA

(Malmo et al., 2012).

Malgré la nuance des observations précédentes, l'effet du DDA sur la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA reste une évidence (Liu, X. et al., 2007). Le DDA signifie le pourcentage des groupements amines désacétylés le long du polymère ce qui module par conséquent la densité de charge du chitosane suite à sa dissolution dans des conditions acides. En effet, une valeur du DDA élevée entraîne une augmentation de la charge positive du chitosane favorisant ainsi la fixation des siRNA et la formation des nanoparticules plus stables (Strand, Issa, Christensen, Vårum, & Artursson, 2008). Une densité de charge élevée affecte aussi la stabilité colloïdale des nanoparticules promouvant l'internalisation cellulaire (Sato, Ishii, & Okahata, 2001). Bien évidemment, le potentiel zêta fournit des mesures déductives de la densité de charge des nanoparticules. Les résultats de notre étude comparative démontrent que les nanoparticules possèdent un potentiel zêta positif qui varie de 13 à 20 mV. Des valeurs du DDA et ratio N : P élevées aboutissent à l'augmentation du potentiel Zêta mesuré. Généralement, la plupart des travaux démontrent un potentiel zêta positif pour les nanoparticules préparées à base de chitosane (Howard et al., 2006; Kiang, Wen, Lim, & Leong, 2004; Lavertu, Methot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006; Sato et al., 2001; Strand et al., 2008). En corrélation avec nos résultats, plusieurs études soulignent un effet du ratio N : P et DDA sur la charge des nanoparticules (Holzerny et al., 2012; Katas & Alpar, 2006; Liu, X. et al., 2007). Par exemple, les études comparatives de Liu et al ont démontré un potentiel zêta positif qui varie en fonction de la valeur du DDA, de 10 à 20 mV, pour un ratio N : P de 50. En effet, une variation du DDA de 84% à 54% aboutit à une diminution du potentiel zêta des nanoparticules chitosane-siRNA (Liu, X. et al., 2007). L'effet du ratio N : P sur la charge a été confirmé par les travaux de katas et al qui démontrent une diminution du potentiel zêta de 60 à 40 mV avec la variation du ratio N:P de 6 à 4 (Katas & Alpar, 2006).

L'influence du ratio N : P et DDA est expliquée par l'augmentation du nombre des charges positives du chitosane qui interagissent avec la charge anionique des siRNA. La charge positive du chitosane assure une dispersion stable des nanoparticules en favorisant ainsi un équilibre des forces attractives et répulsives qui existent entre les nanoparticules chitosane-siRNA (Buschmann et al., 2013). Mis à part son rôle à prévenir l'agrégation, la charge positive des nanoparticules favorise aussi la fixation sur la membrane plasmique chargée négativement. De plus, la charge de surface des nanoparticules influence l'interaction avec les composantes de milieu biologique ce

qui affecte la biodistribution des nanoparticules dans l'organisme (Jeon, Jeong, Jang, Park, & Nah, 2000; Schiffelers, Woodle, & Scaria, 2004).

La caractérisation physicochimique occupe une position cruciale dans le processus de développement d'un système de livraison génique. Le rôle de cette partie est d'élucider l'influence de certains paramètres (pH, masse moléculaire, ratio N : P et DDA) sur la charge, la taille et la stabilité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Ces paramètres affectent le comportement des nanoparticules dans le milieu biologique et influencent certainement leur activité biologique. D'où le recours à une étude *in vitro* afin d'établir une corrélation entre les paramètres physicochimiques du chitosane et l'efficacité de transfection des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA.

5.2 Évaluation de chitosane comme un système de livraison des siRNA ciblant le gène MDR1 dans les cellules MCF-7/mdr (Étude *in vitro*)

Le choix des formulations de chitosane pour effectuer l'étude *in vitro* a été réalisé en basant sur les résultats de la caractérisation physicochimique. Les formulations de chitosane destinées à compléter l'étude *in vitro* possèdent un DDA allant de 80 % à 92% et un poids moléculaire qui varie 10 à 150 kDa. Les formulations présentent un même ratio N : P de 5. Le choix de ce ratio N : P est effectué en interprétant les résultats de la caractérisation physicochimique. En effet, la stabilité des nanoparticules préparées avec un ratio N : P de 5 est relativement élevée pour franchir la membrane plasmique et assurer la libération des siMDR1 dans le cytosol suite à leur décomplexation. De plus, plusieurs études démontrent un silençage génique considérable associé à l'utilisation des nanoparticules préparées avec un ratio N : P de 5 (Alameh et al., 2012; Holzerny et al., 2012; Jean, Myriam et al., 2012). D'autre part, les études de toxicité démontrent que la densité de charge élevée des nanoparticules est associée à une augmentation de la cytotoxicité ce qui confirme le choix d'un ratio N : P relativement faible (Huang et al., 2004). En outre, un ratio N : P élevé interfère avec le dosage des nucléotides ce qui représente une entrave majeure pour ouvrir la voie vers les études cliniques (Buschmann et al., 2013).

La microscopie confocale et la cytométrie en flux ont été utilisés pour évaluer la capacité des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA à franchir la membrane plasmique et atteindre le cytosol des cellules cibles. Tel que discuté précédemment, les formulations utilisées pour cette étude sont alors : 92-10-5, 92-150-5, 80-10-5.

La membrane plasmique des cellules eucaryotes est dotée par une perméabilité sélective pour assurer un échange entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. La membrane cytoplasmique permet la diffusion (actif ou passif) des éléments nutritifs (tels que des ions ou certaines molécules) nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. En effet, il est souhaitable de concevoir un système de livraison capable de contourner cette perméabilité sélective afin d'assurer la pénétration des agents thérapeutiques (dans notre cas des MDR1-siRNA) dont la nature empêche leur diffusion à travers la membrane plasmique. Cependant, certains Xénobiotiques sont capables de franchir la membrane lipidique par diffusion passive (Chhabra, 1979). Néanmoins, il est peu probable que le chitosane adapte cette voie pour pénétrer à l'intérieur des cellules malgré la taille nanométrique des nanoparticules et la capacité de ce polymère à perméabiliser la membrane cytoplasmique en altérant les protéines de jonction serrée (ZO-1) (Schipper, Olsson, Hoogstraate, Vårum, & Artursson, 1997). Des études ont montré que la variation de la température d'incubation (37° et 4 °C) et aussi l'hyperosmolarité affecte le niveau d'internalisation des nanoparticules dans les cellules A549. Sur la base de ces résultats, Huang et al ont conclu que les nanoparticules de chitosane atteignent les compartiments intracellulaires suite à une endocytose d'adsorption, initiée par une interaction non spécifique avec la membrane cellulaire et assurer en partie par un processus dépendant à la clatherine (Huang, Ma, Khor, & Lim, 2002).

Les résultats de la cytométrie en flux supportent les travaux de Huang et al et démontrent que les nanoparticules sont capables de franchir la membrane cytoplasmique des cellules MCF-7/mdr. Le pourcentage de cellules positives pour les quatre formulations de chitosane, atteint un niveau comparable au contrôle positif (DharmaFECT). En revanche, la transfection avec les siGLO nus aboutit à une diminution de nombre des cellules positives ce qui est dû à leur charge anionique et la dégradation rapide dans un milieu contenant 10% de FBS (Leong et al., 1998). Cela souligne l'importance d'un système de livraison pour surmonter cette barrière biologique et assurer un effet thérapeutique des MDR1-siRNA.

Les analyses de cytométrie en flux démontrent aussi que le DDA et la masse moléculaire du chitosane ne possèdent pas un effet significatif sur le pourcentage des cellules transfectées et la moyenne de la fluorescence. Ces résultats sont en corrélation avec les études antérieures effectuées dans notre laboratoire (Alameh et al., 2012; Jean, Myriam et al., 2012). En effet, Alameh et al, ont noté que le pourcentage des cellules positives varie de 50% (chez les cellules

Raw 269.7) à 95% (chez les cellules A549 et HEK 293) pour les mêmes formulations de chitosane ce qui mène à conclure que l'internalisation des nanoparticules chitosane-siRNA dépend en grande partie de la lignée cellulaire (Alameh et al., 2012). La variation de l'internalisation des nanoparticules chitosane-siRNA en fonction des cellules est probablement due à la différence au niveau des voies d'endocytoses adaptées par chaque type cellulaire. En revanche, plusieurs travaux ont démontré un effet considérable des paramètres physicochimiques du chitosane sur l'internalisation des nanoparticules. Par exemple, les travaux de Hang et al ont noté que la masse moléculaire du chitosane et aussi son DDA influencent le niveau d'internalisation des nanoparticules chez les cellules A549. Dans cette étude, la diminution de la masse moléculaire de 213 à 10 kDa et le DDA de 88% à 46% aboutit à une baisse de l'internalisation des nanoparticules de 26% et de 41% respectivement. La réduction du DDA et de la masse moléculaire affecte le potentiel zêta révélant ainsi une corrélation entre l'internalisation des nanoparticules et leur charge (Huang et al., 2004). Un potentiel zêta élevé favorise l'interaction des nanoparticules avec la charge négative de la membrane plasmique menant à une meilleure internalisation des nanoparticules. Ces observations confirment que l'endocytose est initiée par une interaction électrostatique entre les nanoparticules de chitosane et la membrane cellulaire. Le pourcentage élevé des cellules positives observées dans nos résultats de cytométrie en flux pourrait être associé à la charge positive des nanoparticules chitosane/siMDR1-siRNA améliorée par le pH du milieu de transfection. Durant la transfection, l'ajustement du pH à 6,5 entraîne une protonation des groupements amines augmentant ainsi la charge des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA ce qui traduit par une meilleure interaction avec la membrane plasmique. Cela explique le nombre élevé des cellules positives (environ 100%) 24 heures après la transfection à pH 6,5. Ces résultats supportent les études comparatives de Nimesh et al qui ont démontré une meilleure internalisation des nanoparticules à pH 6,5 (100% des cellules positives) contrairement à pH 7,1 (50% des cellules positives). En outre, ces chercheurs ont évalué aussi l'effet du sérum sur l'internalisation des nanoparticules. Nimesh et al ont démontré que la transfection à pH 6,5 et en présence du sérum aboutit à un maximum d'internalisation chez les cellules HEK 293. Ces interprétations affirment la diminution des cellules positives, observée dans la figure 4-12, suite à une transfection en absence du sérum (condition #2). L'explication de l'effet du sérum sur l'internalisation et l'efficacité de transfection des nanoparticules chitosane-siRNA reste peu détaillée. La restriction des informations

pertinentes concernant ce sujet est due à la difficulté de la caractérisation physicochimique (taille et potentiel zéta) des nanoparticules dans un milieu biologique (contenant du sérum) à cause d'un signal de fond élevé. Cependant, l'effet du sérum a été expliqué par l'approvisionnement en énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules y compris l'endocytose des nanoparticules (Buschmann et al., 2013).

D'autre part, l'ajout du sérum n'améliore pas uniquement l'internalisons des nanoparticules chitosane-siRNA. Le sérum présente aussi un impact plus prononcé pour l'internalisation du chitosane seul ce qui est peut être due à la formation des complexes entre le chitosane et les protéines sériques, capables de traverser facilement la membrane plasmique (Nimesh et al., 2010). Ainsi, cette interaction facilite l'endocytose de la fraction libre du chitosane présente dans les nanoparticules préparées à un ratio N : P de 5 (environ 75% de chitosane non complexé) (Ma, Buschmann, & Winnik, 2010). Thibault et al ont démontré que la fraction libre du chitosane existante dans le ratio N:P de 5 améliore l'échappement endosomale et la libération de l'acide nucléique dans le cytoplasme. Ainsi, les nanoparticules préparées avec le chitosane à un ratio N : P de 5 sont capables de franchir la barrière endosomal et assurer la libération des MDR1-siRNA dans le cytosol des cellules observées sous microscopie confocale. L'échappement endosomal des nanoparticules de chitosane/MDR1-siRNA peut être effectué par un mécanisme d'éponge à proton. Dans ce mécanisme, le pouvoir tampon élevé du chitosane (supérieur au PEI) assure une pression osmotique accrue aboutissant à une rupture de la membrane de l'endosome et la libération des nanoparticules (Richard, Thibault, De Crescenzo, Buschmann, & Lavertu, 2013). Cependant, plusieurs études ont démontré que le chitosane possède un temps de trafic vésiculaire intracellulaire élevé comparativement au PEI (Thibault, Nimesh, Lavertu, & Buschmann, 2010). Dans cette perspective, le temps élevé du chitosane dans le lysosome favorise sa dégradation et ainsi l'augmentation de l'osmolartité intravésiculaire aboutissant au mécanisme de l'éponge à proton. Donc, les nanoparticules chitosane-siGLO encore présentes dans le cytoplasme des cellules (24 heures après la transfection) (Figure 4-14) pourraient être piégées dans le lysosome. Des colorations supplémentaires sont requises pour distinguer la colocalisation des nanoparticules par rapport aux compartiments intracellulaires et mieux élucider le transport vésiculaire des nanoparticules chitosane-siRNA.

Le nombre élevé des cellules positives et la puissance du signal observée dans les études d'internalisation pourraient être associés aux nanoparticules encore fixées sur la membrane

cellulaire. La trypsinisation et les lavages par PBS semblent être moins efficaces pour réduire cet artefact expérimental. De ce fait, plusieurs études ont eu recours au traitement avec le Trypan bleu pour analyser seulement le signal intracellulaire (Huang et al., 2004; Innes & Ogden, 1999; Oliveira et al., 2010). L'exclusion de ce colorant à l'extérieur des cellules permet de masquer le signal émis par les nanoparticules encore fixées sur la membrane plasmique et d'analyser la fluorescence des nanoparticules internalisées. Une étude comparative est alors souhaitable pour mieux élucider l'effet du Trypan bleu durant les études d'internalisation des nanoparticules chitosane-siGLO.

La fixation membranaire et l'internalisation des nanoparticules possèdent certainement un rôle essentiel dans le processus de transfection. Malgré la capacité des nanoparticules à franchir ces barrières cellulaires, la libération des siRNA et leur dissociation du chitosane représentent aussi un obstacle majeur. La décomplexation des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA dans le cytoplasme potentialise l'efficacité de transfection qui se traduit par un changement au niveau transcriptomique et l'aboutissement au phénotype désiré.

Une fois dans le cytoplasme, les MDR1-siRNA fixent le complexe multiprotéique RISC et induisent la dégradation de l'ARNm (du gène MDR1) codant pour la protéine cible (dans notre cas Pgp). Suite à la confirmation de l'existence de ce gène par les résultats du séquençage, le niveau de son expression a été évalué par qPCR après la transfection avec siGENOME SMART pool (ciblant le gène MDR1). Cet agent, développé par Dharmacon, représente une combinaison de 4 duplex de siRNA dans le but de diminuer l'expression du gène MDR1 tout en limitant les effets non spécifiques liés au silençage. Le siGENOME SMART pool a été utilisé pour la première fois dans notre laboratoire. Ainsi, le recours à une étude préliminaire est primordial pour évaluer l'efficacité du silençage de ce produit dans la lignée cellulaire MCF-7/mdr connue difficilement transfectable (Appasani, 2005; Uchida, Li, Mertens, & Alpar, 2009). Les résultats de la qPCR démontrent que siGNOME SMART pool aboutit à un silençage génique dépassant 80% (tel que garanti par Dharmacon) avec une efficacité qui dépend de la concentration utilisée. Donc, l'utilisation d'une combinaison des siRNA a été efficace pour inhiber la surexpression du gène MDR1. Néanmoins, les travaux de Stierle et al ont démontré l'inverse. Contrairement aux attentes de ces chercheurs, le recours à une combinaison des séquences des siRNA n'améliore pas l'efficacité du silençage du gène MDR1 comparativement à une seule séquence (Stierle et al., 2007; Stierlé et al., 2005). Par contre, une autre étude dont les résultats sont en corrélation avec

nos résultats a démontré que la combinaison des trois séquences de siRNA engendre un meilleur silençage génique (environ 65%) comparativement à chacune de ces séquences (Abbasi, Meysam et al., 2011). Ces résultats contradictoires sont probablement dus à la conception des siRNA et le type de la lignée cellulaire choisie. La comparaison de nos résultats avec l'étude effectuée par Hao et al permet de souligner encore une autre fois l'efficacité des siGENOME SAMRT pool. En effet, un silençage génique optimal (90%) a été observé suite à la transfection avec 100 nM de siGENOME SMART pool alors qu'Hao et al ont trouvé un maximum d'inhibition du gène MDR1 de 65% malgré le recours au double de la concentration des siRNA (200 nM) (Wu, H., Hait, W. N., & Yang, J.-M., 2003).

D'autre part, cette étude préliminaire démontre une surexpression du gène MDR1 dans la lignée cellulaire résistante (MCF-7/mdr) par rapport aux cellules MCF-7 sensible. Ces résultats s'accordent avec la littérature et confirment que le phénotype de la chimiorésistance est associé en partie à la surexpression du gène MDR1 codant pour la Pgp. Des études antérieures ont démontré que la ligné MCF-7/mdr est 200 fois plus résistante à l'action de l'agent anticancéreux comparativement à la ligné sensible, ce qui est dû à la surexpression du gène MDR 1 (60 fois plus amplifié) (Cowan et al., 1986; Fairchild et al., 1987).

Les résultats de cette étude préliminaire approuvent le choix des siGENOME SMART Pool pour diminuer l'expression du gène responsable de la résistance chez les cellules MCF-7/mdr. Étant donné sa capacité à induire un silençage génique optimal, la concentration 100 nM a été choisie pour accomplir les études *in vitro* et mettre en évidence le potentiel du chitosane comme un système de livraison des MDR1-siRNA. En plus de son efficacité, cette concentration n'affecte pas l'activité métabolique de cellules suite aux résultats trouvés par le test d'Alamar bleu (Figure 4-15).

La transfection avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA aboutit à une diminution de l'expression du gène MDR1. L'effet de silençage supporte les observations de la microscopie confocale et confirme ainsi la libération des MDR1-siRNA dans le cytosol et leur interaction avec l'ARNm cible suite à la transfection par les nanoparticules préparées avec les formulations 92-10-5 et 92-150-5. Les résultats de la qPCR démontrent une corrélation entre la masse moléculaire du chitosane et l'efficacité de silençage. En effet, les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées à base de chitosane caractérisé par une masse moléculaire élevée (92-150-5) induisent un effet de silençage plus important (80% de silençage). Ces

observations sont en corrélation avec les travaux de Liu et al. Ces chercheurs ont démontré que le niveau du silençage de la protéine fluorescente verte (EGFP) est comparable au contrôle positif (TransIT-TKO) suite à la transfection avec des nanoparticules préparées avec du chitosane dont la masse moléculaire varie de 114 kDa à 170 kDa (Liu, X. et al., 2007). Ciblant la même protéine, Techapornkul et al ont noté cependant que l'augmentation de la masse moléculaire du chitosane de 200 à 460 kDa possède un effet inhibiteur sur le taux de silençage des nanoparticules chitosane-siRNA (Techapornkul et al., 2010). Ces résultats contradictoires sont peut-être associés au type de la lignée cellulaire choisie et le processus suivi pour effectuer la transfection.

Les résultats de la qPCR mettent encore en évidence le potentiel de la formulation 92-10-5, largement utilisé dans notre laboratoire. En effet, les analyses ont démontré que la transfection avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées à base de cette formulation aboutit à un silençage génique du gène MDR1 dépassant 60%. Ces résultats supportent alors les études effectuées dans notre laboratoire (étude *in vitro* et *in vivo*) et confirment la performance de cette formulation à transporter les siRNA (Alameh et al., 2012; De Jesus, 2011; Jean, M, Alameh, Buschmann, & Merzouki, 2011; Jean, Myriam et al., 2012).

Un autre paramètre qui ne manque pas d'importance a été mis en évidence durant les analyses par qPCR. En effet, les résultats dévoilent un impact de la condition de transfection sur l'efficacité du silençage. L'ajout du FBS 5 heures après la transfection (condition #2) améliore le niveau du silençage associé à chaque formulation indépendamment de la masse moléculaire du chitosane. Cet effet est plus prononcé pour la formulation de chitosane avec la masse moléculaire élevé (92-150-5). L'efficacité du silençage associé aux nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées avec cette formulation augmente de 60%, suite à la transfection en présence de FBS (condition#1), à 85% avec la condition #2. De même, cette amélioration de l'efficacité du silençage en fonction de la condition de transfection a été notée chez les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA préparées avec la formulation 92-10-5. L'influence du FBS sur l'efficacité du silençage a été aussi présente au niveau phénotypique par une diminution de l'expression de la Pgp. L'impact de la méthode de transfection sur l'efficacité du silençage pourrait être expliqué par la désintégration des nanoparticules en présence du sérum. Durant la condition# 1, le FBS déjà présent dans le milieu de transfection induirait la décomplexation des nanoparticules ce qui en résulte la dégradation des MDR1-siRNA par les nucléases et la

diminution leurs effets du silençage. D'autre part, Howard et al ont démontré que les nanoparticules chitosane-siRNA sont capables de franchir la membrane plasmique et déclencher le mécanisme d'ARN interférence durant les 4 heures suivant la transfection (Howard et al., 2006). Alors, le FBS ajouté 5 heures après la transfection (condition #2) n'aura pas un effet inhibiteur puisque la plupart des nanoparticules sont déjà internalisées dans la cellule ce qui explique l'amélioration de silençage en suivant cette condition.

Plusieurs chercheurs ont élucidé l'influence du sérum sur la stabilité des nanoparticules. Cet effet a été expliqué par la compétition entre les siRNA et les protéines du sérum chargées négativement (telles que l'albumine) pour fixer le polymère cationique (dans notre cas le chitosane) (Buyens et al., 2008; Buyens et al., 2010) . Dans le même contexte, MacLaughlin et al ont noté que la dissociation des nanoparticules suite à leur exposition à 10% FBS dépend de la masse moléculaire du chitosane. En effet, les formulations de chitosane caractérisées par une masse moléculaire élevée aboutissent à des nanoparticules plus stables dans le FBS (MacLaughlin et al., 1998). Cela explique le potentiel des nanoparticules préparées à base de chitosane 92-150-5 à induire un silençage génique même en présence de FBS dans le milieu de transfection (condition #1).

Le silençage au niveau transcriptomique a été élucidé avec succès sur le plan phénotypique par les résultats de *western blot*. Cette technique a été utilisée pour la première fois dans notre laboratoire afin de valider le potentiel des MDR1-siRNA, transportés par le chitosane, à dégrader l'ARNm cible et inhiber la traduction et la synthèse de la Pgp.

Supportant les données de la qPCR, les résultats de *western blot* révèlent l'influence de la masse moléculaire du chitosane et la condition de transfection sur l'efficacité du silençage.

Caractérisé par une masse moléculaire élevée, le chitosane 92-150 est capable de protéger les MDR1-siRNA dans des nanoparticules stables malgré l'effet désintégrant du FBS présent dans le milieu de transfection (condition #1). Ainsi, les nanoparticules préparées à base de chitosane 92-150 sont capables de franchir la membrane plasmique et échapper la barrière endosomal tout en assurant la libération des MDR1-siRNA. Une fois dans le cytosol, les MDR1-siRNA sont capables de dégrader l'ARNm cible ce qui engendre une inhibition de la traduction et la synthèse de la Pgp. Cela se traduit au niveau de *western blot* par une diminution de l'intensité des bandes spécifique au Pgp à un niveau comparable au contrôle positif (DharmaFECT). Étant stables et efficaces dans un milieu riche en protéines, les nanoparticules préparées à base de chitosane 92-

150 sont capables certainement de maintenir leur stabilité dans la circulation sanguine malgré l'effet décomplexant des protéines sériques. L'absence de cytotoxicité associée au chitosane 92-150 et son efficacité de livraison en présence du sérum pourrait favoriser le choix de la formulation 92-150-5 pour évaluer sa performance dans une étude *in vivo*.

En outre, le recours à la condition # 2 de transfection améliore l'efficacité du silençage associée à la formulation 92-150-5 jusqu'à atteindre un niveau du silençage supérieur même au contrôle positif (DharmaFECT) ce qui est expliqué par la diminution de l'expression de Pgp à un niveau comparable aux cellules MCF-7 sensibles.

Ces résultats appuyés par les analyses de l'Alamar bleu pourraient ouvrir la voie vers la commercialisation et la mise au point de la formulation 92-150-5 comme un réactif de transfaction des siRNA non toxique qui pourrait rivaliser avec les systèmes de livraisons lipidiques (Oligofectamine et DharmaFECT) connues cytotoxiques (Suggate et al., 2009).

Plusieurs études ont évalué l'effet du silençage génique du gène MDR1 au niveau phénotypique. La plupart de ces travaux ont eu recours aux systèmes de livraisons lipidiques (Lipofectamine et Oligofectamine) pour transporter les siRNA ciblant la Pgp. Utilisant le double de la concentration des siRNA (200nM) transportés par Oligofectamine, Hao et al ont rapporté que l'inhibition maximale de la Pgp atteint 65% induisant une sensibilisation des cellules MCF-7/mdr à l'action de la Doxorubicine (augmentation de la toxicité de la Doxorubicine d'un facteur de 12) (Wu, Hao et al., 2003). De même, Xiao et al ont démontré que le meilleur silençage génique obtenu pour la Pgp ne dépasse pas 60% suite à la transfaction avec 100nM de siRNA en utilisant le Lipofectamine (Xiao et al., 2008). Quels que soient le système de livraison et la concentration des siRNA utilisée, le meilleur silençage génique rapporté dans la littérature a été caractérisé par une diminution de 80% du taux de la Pgp (Abbasi, Meysam et al., 2013). Jusqu' à présent, les résultats de *Western blot* (Figure 4-19) représentent les seules données qui démontrent une extinction totale de la Pgp en utilisant les siRNA comme un agent de silençage. Ces résultats élicitent la capacité du chitosane 92-150-5 à transporter les MDR1-siRNA tout en potentialisant leur effet à inverser le phénotype de résistance chez les cellules MCF-7/mdr. Les études qui visent à contourner la chimiorésistance ont démontré une corrélation entre la diminution de l'expression de la Pgp et l'augmentation de l'efficacité de la Doxorubicine (Abbasi, Meysam et al., 2013).

En effet, l'inhibition spécifique de l'expression de la Pgp par les MDR1-siRNA permet

certainement de restaurer la sensibilité des cellules résistantes à un niveau comparable aux lignées sensibles. La diminution de l'expression du transporteur membranaire (Pgp) induit une augmentation de la concentration intracellulaire de la Doxorubicine et son accumulation dans le noyau des cellules résistantes stimulant ainsi son activité antitumorale. Défini comme la dose provoquant 50% de mortalité des cellules, il est important de réduire la DL50 de la Doxorubicine pour obtenir un maximum d'effet thérapeutique avec un minimum de toxicité pour les cellules saines (Yassin, Albekairy, Alkatheri, & Sharma, 2013). En effet, la suppression totale de la Pgp suite à la transfection par les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA constituerait sans doute une avancée majeure pour améliorer le rapport thérapeutique du médicament anticancéreux et réduire les effets secondaires du traitement.

L'absence de la variation de l'expression de la β -actine supporte encore le choix des siGENOME SMART pool et confirme l'absence des effets non spécifiques associés à la combinaison des siRNA. D'autre part, les résultats de la qPCR démontrent que la transfection par le chitosane seul n'affecte pas l'expression du gène (MDR1) ce qui confirme l'absence des effets non spécifiques du silençage liés à ce système de livraison. Ces deux caractéristiques jumelées ensemble supportent l'efficacité du chitosane comme un système de livraison des MDR1-siRNA, capable d'inhiber spécifiquement l'expression du gène MDR1 et induire une extinction totale de la Pgp.

La voie la plus prometteuse est sans doute d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie en limitant la toxicité pour les cellules saines. Suite à la suppression totale de la Pgp, il est ainsi possible d'utiliser les médicaments anticancéreux à faible dose et ceci dans l'espoir de réduire les effets secondaires du traitement, et améliorer ainsi la qualité de vie des patients.

CONCLUSION

La chimiothérapie fait partie de l'arsenal thérapeutique pour traiter divers types de cancer. Cependant, son efficacité est souvent limitée par des phénomènes de résistances développées par les cellules cancéreuses. La résistance est responsable de l'échec de la chimiothérapie chez plus que 90% des patients atteints du cancer métastatique.

La chimiorésistance est souvent associée à la surexpression des protéines d'efflux membranaires dont la plus connue est la glycoprotéine P (Pgp). Alors, il est important de contourner l'activité de cette protéine pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie. Plusieurs composés chimiques possèdent ce rôle inhibiteur mais leur application clinique a été limitée par des effets secondaires graves. Connue par leur capacité à inhiber spécifiquement l'expression d'un gène, les petits ARN interférents (siRNA) sont choisis pour le silençage de l'expression de la Pgp et contourner son activité de pompe à efflux des médicaments anticancéreux. L'inefficacité des siRNA à dépasser les barrières biologiques et atteindre le cytosol des cellules cibles suscite l'utilisation d'un système de livraison pour assurer le pouvoir thérapeutique des petits ARN interférents.

Le chitosane représente le système de choix dans ce présent travail grâce à son excellente biocompatibilité et sa capacité à former des nanoparticules avec les siRNA dans un processus simple et rapide. Le processus de complexation est établi grâce aux liaisons électrostatiques entre le chitosane et les groupements phosphates des siRNA. La caractérisation physicochimique a démontré que la méthode de complexation spontanée aboutit entre à la formation des nanoparticules dont les propriétés dépendent des paramètres physicochimiques du chitosane (DDA, MM et N : P). De plus, les nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA sont capables de franchir la membrane cytoplasmique des cellules MCF-7/mdr et libérer les siRNA dans le cytosol des cellules. L'échappement endosomique des nanoparticules et la libération des siRNA aboutissent au déclenchement du mécanisme d'ARN interférence engendrant une diminution de l'ARNm du gène cible (MDR1). L'efficacité du silençage des nanoparticules dépend, pour le même ratio N : P, de la procédure de transfection et de la masse moléculaire du chitosane. Dans une première tentative dans notre laboratoire, le silençage génique a été confirmé au niveau phénotypique par une diminution de l'expression de la Pgp à un niveau comparable à la lignée sensible. Les résultats ont démontré aussi que les nanoparticules présentent une toxicité négligeable pour les

cellules indépendamment des paramètres physicochimiques du chitosane. En guise de conclusion, les travaux de ce projet ont démontré que le chitosane est capable de transporter les petits ARN interférents de façon efficace et sécuritaire induisant ainsi la diminution de l'expression de la Pgp. Ces résultats prometteurs mettent aussi en évidence les paramètres qui influencent l'efficacité du silençage des nanoparticules chitosane/MDR1-siRNA. Sur la base de ces données, une étude de toxicité serait alors nécessaire pour évaluer l'effet des nanoparticules à contourner la chimiorésistance chez les cellules cancéreuses. La nature de l'indicateur de toxicité dans cette étude devra être choisie de façon à éviter son interaction avec l'activité de la Pgp.

Une étude de la cinétique du silençage serait aussi importante afin de choisir le moment opportun de la chimiothérapie, durant lequel la Pgp devra présenter un minimum de son d'activité. D'un autre côté, cette étude permettrait d'élucider en partie l'influence des paramètres physicochimiques du chitosane sur la cinétique de la libération des siRNA et leur effet en fonction du temps. Néanmoins, il reste encore beaucoup de détails à clarifier concernant le comportement des nanoparticules dans le sang et leur interaction avec les protéines sériques. Une caractérisation physicochimique des nanoparticules dans le milieu biologique serait alors envisagée afin de fournir assez d'informations concernant ce sujet. Ces données combinées avec les résultats d'une étude systématique de toxicité pourraient ouvrir la voie vers l'évaluation de la performance des nanoparticules *in vivo*.

Espérant qu'ils aboutissent au profil souhaité, les travaux proposés ci-dessus pourraient être un tremplin vers une étude préclinique enrichissant le patrimoine scientifique québécois.

Ce projet de recherche marquerait sans doute le domaine de la cancérologie et permettrait d'alléger en partie les pertes économiques associées à ce sujet. En effet, en présence de la multirésistance aux agents chimiothérapeutique (MDR), les couts du traitement augmentent car les médicaments anticancéreux administrés sont inefficaces d'où l'utilisation d'une molécule plus puissante et généralement plus couteuse. Ce projet, qui vise à augmenter l'efficacité des programmes de la chimiothérapie, permet donc d'alléger ces pertes économiques et contrôler le développement de la tumeur chez les patients améliorant leur qualité de vie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi, M., Aliabadi, H. M., Moase, E. H., Lavasanifar, A., Kaur, K., Lai, R., . . . Uludağ, H. (2011). siRNA-mediated down-regulation of P-glycoprotein in a Xenograft tumor model in NOD-SCID mice. *Pharmaceutical research*, 28(10), 2516-2529.
- Abbasi, M., Lavasanifar, A., & Uludağ, H. (2011). Recent attempts at RNAi-mediated P-glycoprotein downregulation for reversal of multidrug resistance in cancer. *Medicinal Research Reviews*.
- Abbasi, M., Lavasanifar, A., & Uludağ, H. (2013). Recent attempts at RNAi-mediated P-glycoprotein downregulation for reversal of multidrug resistance in cancer. *Medicinal research reviews*, 33(1), 33-53.
- Akhtar, N., Ahad, A., Khar, R. K., Jaggi, M., Aqil, M., Iqbal, Z., . . . Talegaonkar, S. (2011). The emerging role of P-glycoprotein inhibitors in drug delivery: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(4), 561-576.
- Akhtar, S., & Benter, I. (2007). Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Advanced drug delivery reviews*, 59(2), 164-182.
- Akhtar, S., & Benter, I. F. (2007). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3623.
- Alameh, M., DeJesus, D., Jean, M., Darras, V., Thibault, M., Lavertu, M., . . . Merzouki, A. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N: P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *International journal of nanomedicine*, 7 1399.
- Allan, G. G., & Peyron, M. (1995). Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate research*, 277(2), 257-272.
- Alshamsan, A., Haddadi, A., Incani, V., Samuel, J., Lavasanifar, A., & Uludag, H. (2008). Formulation and delivery of siRNA by oleic acid and stearic acid modified polyethylenimine. *Molecular pharmaceutics*, 6(1), 121-133.
- Amarzguioui, M., & Prydz, H. (1998). Hammerhead ribozyme design and application. *Cellular and molecular life sciences*, 54(11), 1175-1202.
- Amarzguioui, M., & Prydz, H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochemical and biophysical research communications*, 316(4), 1050-1058.
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter 1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 361-398.
- Amiji, M. M., Horncik, F., & Duan, Z. (2011). Gene Silencing with siRNA Encapsulated Nanoparticles to Overcome Tumor Multidrug Resistance. *Nanomedicine and Cancer* 290.
- Appasani, K. (2005). *RNA interference technology: from basic science to drug development*: Cambridge University Press.
- Arzt, J. H. L. (1927). Radiumchirurgie des Brustkrebses. *Dtsch Med Wochenschr*, 53(34), 1419-1421.

- Badot, P. M., Crini, G., & Guibal, É. (2009). *Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application*: Presses universitaires de Franche-Comté.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. (1962). Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et biophysica acta*, 58(1), 102-119.
- Belhoussine, R., Morjani, H., Sharonov, S., Ploton, D., & Manfait, M. (1999). Characterization of intracellular pH gradients in human multidrug-resistant tumor cells by means of scanning microspectrofluorometry and dual-emission-ratio probes. *International journal of cancer*, 81(1), 81-89.
- Bell, D. R., Trent, J. M., Willard, H. F., Riordan, J. R., & Ling, V. (1987). Chromosomal location of human P-glycoprotein gene sequences. *Cancer genetics and cytogenetics*, 25(1), 141-148.
- Bergman, P. J., & Harris, D. (1997). Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance. The past, present, and future. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 27(1), 47.
- Berx, G., & Van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6).
- Bhatia, A., Schäfer, H. J., & Hrycyna, C. A. (2005). Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry*, 44(32), 10893-10904.
- Birmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., . . . Karpilow, J. (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature methods*, 3(3), 199-204.
- Boesch, D., Gavériaux, C., Jachez, B., Pourtier-Manzanedo, A., Bollinger, P., & Loor, F. (1991). In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer research*, 51(16), 4226-4233.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7297-7301.
- Brookes, P., & Lawley, P. (1961). The reaction of mono-and di-functional alkylating agents with nucleic acids. *Biochemical Journal*, 80(3), 496.
- Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Advanced drug delivery reviews*, 65(9), 1234-1270.
- Buyens, K., De Smedt, S. C., Braeckmans, K., Demeester, J., Peeters, L., van Grunsven, L. A., . . . Farkasova, K. (2012). Liposome based systems for systemic siRNA delivery: stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. *Journal of Controlled Release*, 158(3), 362-370.

- Buyens, K., Lucas, B., Raemdonck, K., Braeckmans, K., Vercammen, J., Hendrix, J., . . . Sanders, N. N. (2008). A fast and sensitive method for measuring the integrity of siRNA-carrier complexes in full human serum. *Journal of controlled release*, 126(1), 67-76.
- Buyens, K., Meyer, M., Wagner, E., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Sanders, N. N. (2010). Monitoring the disassembly of siRNA polyplexes in serum is crucial for predicting their biological efficacy. *Journal of controlled release*, 141(1), 38-41.
- Carmell, M. A., & Hannon, G. J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature structural & molecular biology*, 11(3), 214-218.
- Cassady, J. M., & Douros, J. D. (1980). *Anticancer agents based on natural product models* (vol. 16): Academic Press New York.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 118-132.
- Chalk, A. M., Wahlestedt, C., & Sonnhammer, E. L. L. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(1), 264-274.
- Chandy, T., & Sharma, C. P. (1990). Chitosan-as a biomaterial. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 18(1), 1-24.
- Chen, C., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M., & Roninson, I. (1986). Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the mdr1 (P-Glycoprotein). *Cell*, 47 381-389.
- Chen, M., & Beck, W. T. (1995). DNA topoisomerase II expression, stability, and phosphorylation in two VM-26-resistant human leukemic CEM sublines. *Oncology research*, 7(2), 103-111.
- Chhabra, R. S. (1979). Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics. *Environmental health perspectives*, 33 61.
- Chithrani, B. D., & Chan, W. C. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters*, 7(6), 1542-1550.
- Cho, W. G., Albuquerque, R. J. C., Kleinman, M. E., Tarallo, V., Greco, A., Nozaki, M., . . . De Falco, M. (2009). Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7137-7142.
- Cogoni, C., & Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *nature*, 399(6732), 166-169.
- Cole, S., Bhardwaj, G., Gerlach, J., Mackie, J., Grant, C., Almquist, K., . . . Deeley, R. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (New York, NY)*, 258(5088), 1650.
- Conseil, G., Perez-Victoria, J. M., Jault, J. M., Gamarro, F., Goffeau, A., Hofmann, J., & Di Pietro, A. (2001). Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity. *Biochemistry*, 40(8), 2564-2571.

- Cowan, K. H., Batist, G., Tulpule, A., Sinha, B. K., & Myers, C. E. (1986). Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9328-9332.
- Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygün, H., Klippe, A., Pronk, G. J., . . . Kaufmann, J. (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 31(11), 2705-2716.
- Dahl, G. V., Lacayo, N. J., Brophy, N., Dunussi-Joannopoulos, K., Weinstein, H. J., Chang, M., . . . Arceci, R. J. (2000). Mitoxantrone, etoposide, and cyclosporine therapy in pediatric patients with recurrent or refractory acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology*, 18(9), 1867-1875.
- Dai, Y., Zhang, F., Chen, N., Wang, G., Jia, S., & Zheng, H. (2010). *Analysis of P-glycoprotein structure and binding sites* (p. 101-103).
- Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., & Del Tacca, M. (2002). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clinical pharmacokinetics*, 41(6), 431-444.
- Davidson, B. L., & McCray, P. B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews Genetics*, 12(5), 329-340.
- de Fougerolles, A. R. (2008). Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Human gene therapy*, 19(2), 125-132.
- De Jesus, D. L. (2011). *Silencage génique de l'ARNm codant pour l'apolipoprotéine B après administration par voie intraveineuse de nanoparticules chitosane/siARN-ApoB dans un modèle murin d'athérosclérose*. (École Polytechnique de Montréal).
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7), 1007-1017.
- Ding, Y., Chan, C. Y., & Lawrence, C. E. (2004). Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic acids research*, 32(suppl 2), W135-W141.
- Dolderer, J., Zimmer, G., Woodcock, B., Bockhorn, H., Bickeboller, R., & Schuldes, H. (2000). Resistance modulation in CHO cells by R-verapamil and bile salts is associated with physical and chemical changes in the cell membrane. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 38(4), 196-203.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15665-15670.
- Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115 199-208.
- Dykxhoorn, D., Palliser, D., & Lieberman, J. (2006). The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene therapy*, 13(6), 541-552.
- Ebbell, B. (1937). *The Papyrus Ebers: the greatest Egyptian medical document*: Levin & Munksgaard.

- 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(6836), 494-498.
- Endicott, J. A., & Ling, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 137-171.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., & Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 9-22.
- Fairchild, C. R., Ivy, S. P., Kao-Shan, C.-S., Whang-Peng, J., Rosen, N., Israel, M. A., . . . Goldsmith, M. E. (1987). Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer research*, 47(19), 5141-5148.
- Fang, N., Chan, V., Mao, H. Q., & Leong, K. W. (2001). Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules*, 2(4), 1161-1168.
- Fedorov, Y., King, A., Anderson, E., Karpilow, J., Ilsley, D., Marshall, W., & Khvorova, A. (2005). Different delivery methods—different expression profiles. *Nature methods*, 2(4), 241-241.
- Feldman, R. P., & Goodrich, J. T. (1999). The Edwin Smith Surgical Papyrus. *Child's Nervous System*, 15(6), 281-284.
- Fernandes, J. C., Tiera, M. J., & Winnik, F. M. (2007). DNA-Chitosan Nanoparticles for Gene Therapy: Current Knowledge and Future Trends. *Nanotechnologies for the Life Sciences*.
- Ferry, D., Traunecker, H., & Kerr, D. (1996). Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 32(6), 1070.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 453-458.
- Fire, A., Xu, S. Q., 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(6669), 806-811.
- Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J., & Pfaffl, M. W. (2006). Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology letters*, 28(19), 1601-1613.
- Ford, J. M. (1990). Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev*, 42 155-199.
- Foxwell, B., Mackie, A., Ling, V., & Ryffel, B. (1989). Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Molecular pharmacology*, 36(4), 543-546.
- Frank, M. H., Denton, M. D., Alexander, S. I., Khouri, S. J., Sayegh, M. H., & Briscoe, D. M. (2001). Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro. *The Journal of Immunology*, 166(4), 2451-2459.
- Frei, E., Jaffe, N., Tattersall, M. H. N., Pitman, S., & Parker, L. (1975). New Approaches to Cancer Chemotherapy with Methotrexate. *New England Journal of Medicine*, 292(16), 846-851. doi: doi:10.1056/NEJM197504172921607

- Frezard, F., Pereira-Maia, E., Quidu, P., Priebe, W., & Garnier-Suillerot, A. (2001). P-Glycoprotein preferentially effluxes anthracyclines containing free basic versus charged amine. *European Journal of Biochemistry*, 268(6), 1561-1567.
- Gigli, M., Rasoanaivo, T. W. D., Millot, J. M., Jeannesson, P., Rizzo, V., Jardillier, J. C., . . . Manfait, M. (1989). Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. *Cancer research*, 49(3), 560-564.
- Gilmore, I. R., Fox, S. P., Hollins, A. J., Sohail, M., & Akhtar, S. (2004). The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *Journal of drug targeting*, 12(6), 315-340.
- Gitlin, L., & Andino, R. (2003). Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *Journal of virology*, 77(13), 7159-7165.
- Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual review of biochemistry*, 62(1), 385-427.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M., Domb, A., Trubetskoy, V., Torchilin, V., & Langer, R. (2002). Poly (ethyleneglycol)-Coated Nanospheres: Potential Carriers for Intravenous Drug Administration. *Protein Delivery* 167-198.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *nature*, 466(7308), 835-840.
- Guy, J., Drabek, D., & Antoniou, M. (1995). Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Molecular biotechnology*, 3(3), 237-248.
- Halsted, W. S. (1898). I. A Clinical and Histological Study of certain Adenocarcinomata of the Breast: and a Brief Consideration of the Supraclavicular Operation and of the Results of Operations for Cancer of the Breast from 1889 to 1898 at the Johns Hopkins Hospital. *Annals of surgery*, 28(5), 557.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., & Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science Signalling*, 293(5532), 1146.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., . . . Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5), 887-902.
- Hande, K. R. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400(1), 173-184.
- Hang, Y. (1990). Chitosan production from Rhizopus oryzae mycelia. *Biotechnology letters*, 12(12), 911-912.
- Hannon, G. J., & Rossi, J. J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *nature*, 431(7006), 371-378.
- Harris, J., Morrow, M., & Norton, L. (1997). Malignant tumors of the breast. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, PA, Lippincott 1557-1616.

- Hejazi, R., & Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of controlled release*, 89(2), 151-165.
- Holleb, A. I., & Randers-Pehrson, M. B. (1775). *Classics in oncology*: American Cancer Society.
- Hollins, A. J., Omidi, Y., Benter, I. F., & Akhtar, S. (2007). Toxicogenomics of drug delivery systems: Exploiting delivery system-induced changes in target gene expression to enhance siRNA activity. *Journal of drug targeting*, 15(1), 83-88.
- Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., & Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: Profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *Journal of controlled release*, 157(2), 297-304.
- Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. Ø., . . . Besenbacher, F. (2006). RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular Therapy*, 14(4), 476-484.
- Hrdina, R., Gersl, V., Klimtová, I., Simunek, T., Machackova, J., & Adamcová, M. (2000). Anthracycline-induced cardiotoxicity. *ACTA MEDICA-HRADEC KRALOVE-*, 43(3), 75-82.
- Huang, M., Fong, C.-W., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of controlled release*, 106(3), 391-406.
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*, 21(2), 344-353.
- Huang, M., Ma, Z., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2002). Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharmaceutical research*, 19(10), 1488-1494.
- Innes, N., & Ogden, G. (1999). A technique for the study of endocytosis in human oral epithelial cells. *Archives of oral biology*, 44(6), 519-523.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., . . . Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature biotechnology*, 21(6), 635-637.
- Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., . . . Nichols, K. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *Rna*, 12(7), 1197-1205.
- Jackson, A. L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B. N., Cleary, M., Lim, L., & Linsley, P. S. (2006). Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Rna*, 12(7), 1179-1187.
- Jayr, C., & Muret, J. (2010). Mécanismes de l'oncogenèse et principe des traitements anticancéreux: implication pour l'anesthésiste. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, 14(6), 347-366.
- Jean, M., Alameh, M., Buschmann, M., & Merzouki, A. (2011). Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene therapy*, 18(8), 807-816.

- Jean, M., Alameh, M., De Jesus, D., Thibault, M., Lavertu, M., Darras, V., . . . Merzouki, A. (2012). Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of *i* in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1), 138-149.
- Jean, M., Smaoui, F., Lavertu, M., Methot, S., Bouhdoud, L., Buschmann, M., & Merzouki, A. (2009). Chitosan–plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene therapy*, 16(9), 1097-1110.
- Jeon, H.-J., Jeong, Y.-I., Jang, M.-K., Park, Y.-H., & Nah, J.-W. (2000). Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International journal of pharmaceutics*, 207(1), 99-108.
- Ji, A., Su, D., Che, O., Li, W., Sun, L., Zhang, Z., . . . Xu, F. (2009). Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes. *Nanotechnology*, 20(40), 405103.
- Jones, L., Ratcliff, F., & Baulcombe, D. C. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biology*, 11(10), 747-757.
- Jones, L. J., Yue, S. T., Cheung, C.-Y., & Singer, V. L. (1998). RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Analytical biochemistry*, 265(2), 368-374.
- Jorgensen, R. A., Cluster, P. D., English, J., Que, Q., & Napoli, C. A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant molecular biology*, 31(5), 957-973.
- Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C. H., & MacLachlan, I. (2006). Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Molecular Therapy*, 13(3), 494-505.
- Juliano, R., Bauman, J., Kang, H., & Ming, X. (2009). Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Molecular pharmaceutics*, 6(3), 686-695.
- Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta*, 455(1), 152.
- Kasper, J. C., Schaffert, D., Ogris, M., Wagner, E., & Friess, W. (2011). The establishment of an up-scaled micro-mixer method allows the standardized and reproducible preparation of well-defined plasmid/LPEI polyplexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(1), 182-185.
- Kastan, M. B., Canman, C. E., & Leonard, C. J. (1995). P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 14(1), 3-15.
- Katas, H., & Alpar, H. O. (2006). Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of controlled release*, 115(2), 216-225.
- Kawakami, S., & Hashida, M. (2007). Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 22(3), 142-151.

- Keynes, G. (1937). Conservative treatment of cancer of the breast. *British medical journal*, 2(4004), 643-666.
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 25(22), 5293-5301.
- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), 173-184.
- Kiple, K. F. (2003). *The Cambridge historical dictionary of disease*: Cambridge University Press.
- Klappe, K., Hinrichs, J. W. J., Kroesen, B. J., Sietsma, H., & Kok, J. W. (2004). MRP1 and glucosylceramide are coordinately over expressed and enriched in rafts during multidrug resistance acquisition in colon cancer cells. *International journal of cancer*, 110(4), 511-522.
- Köping-Högård, M., Mel'nikova, Y. S., Vårum, K. M., Lindman, B., & Artursson, P. (2003). Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. *The journal of gene medicine*, 5(2), 130-141.
- Kortylewski, M., Swiderski, P., Herrmann, A., Wang, L., Kowolik, C., Kujawski, M., . . . Yang, C. (2009). In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses. *Nature biotechnology*, 27(10), 925-932.
- Krishna, R., & Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European journal of pharmaceutical sciences*, 11(4), 265-283.
- Lage, H. (2005a). *Reversal of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by RNA interference*. Communication présentée à International Congress Series (vol. 1277, p. 144-153).
- Lage, H. (2005b). *Reversal of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by RNA interference* (vol. 1277, p. 144-153).
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science Signalling*, 294(5543), 853.
- Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824.
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824.
- Lazebnik, Y. (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 232-233.
- Le Bras, B., Barallobre, M. J., Homman-Ludiye, J., Ny, A., Wyns, S., Tammela, T., . . . Muriel, M. P. (2006). VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nature neuroscience*, 9(3), 340-348.

- Lee, C. H., Bradley, G., Zhang, J. T., & Ling, V. (1993). Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocyte culture. *Journal of cellular physiology*, 157(2), 392-402.
- LeHoux, J., & Grondin, F. (1993). Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, 132(3), 1078-1084.
- Leonard, G. D., Fojo, T., & Bates, S. E. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist*, 8(5), 411-424.
- Leong, K., Mao, H.-Q., Truong-Le, V., Roy, K., Walsh, S., & August, J. (1998). DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of controlled release*, 53(1), 183-193.
- Leschziner, G., Andrew, T., Pirmohamed, M., & Johnson, M. (2006). ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *The pharmacogenomics journal*, 7(3), 154-179.
- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), 787-798.
- Li, C. X., Parker, A., Menocal, E., Xiang, S., Borodiansky, L., & Fruehauf, J. H. (2006). Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*, 5(18), 2103-2109.
- Li, L., Xu, J., Min, T., & Huang, W. (2006). Reversal of *MDR1* gene-dependent multidrug resistance using low concentration of endonuclease-prepared small interference RNA. *European journal of pharmacology*, 536(1), 93-97.
- Li, S., & Huang, L. (2006). Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene therapy*, 13(18), 1313-1319.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., . . . Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *nature*, 433(7027), 769-773.
- Liu, C., Zhao, G., Liu, J., Ma, N., Chivukula, P., Perelman, L., . . . Yu, L. (2009). Novel biodegradable lipid nano complex for siRNA delivery significantly improving the chemosensitivity of human colon cancer stem cells to paclitaxel. *Journal of controlled release*, 140(3), 277-283.
- Liu, F., Chen, Z., Wang, J., Shao, X., Cui, Z., Yang, C., . . . Xiong, D. (2008). Overexpression of cell surface cytokeratin 8 in multidrug-resistant MCF-7/MX cells enhances cell adhesion to the extracellular matrix. *Neoplasia (New York, NY)*, 10(11), 1275.
- Liu, G., Wong-Staal, F., & Li, Q. (2007). Development of new RNAi therapeutics. *Histology and histopathology*, 22(1/3), 211.
- Liu, W., Sun, S., Cao, Z., Zhang, X., Yao, K., Lu, W. W., & Luk, K. (2005). An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, 26(15), 2705-2711.
- Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. Ø., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., . . . Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6), 1280-1288.

- LO, Y. L., LIU, F. I., YANG, J. M., & CHERNG, J. Y. (2001). Reversal of multidrug resistance to epirubicin by cyclosporin A in liposomes or intralipid. *Anticancer research*, 21(1A), 445-450.
- Lou, Y. L., Peng, Y. S., Chen, B. H., Wang, L. F., & Leong, K. W. (2009). Poly (ethylene imine)-g-chitosan using EX-810 as a spacer for nonviral gene delivery vectors. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88(4), 1058-1068.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G., & Krug, R. M. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology*, 214(1), 222.
- Ma, P. L., Buschmann, M. D., & Winnik, F. o. M. (2010). One-step analysis of DNA/chitosan complexes by field-flow fractionation reveals particle size and free chitosan content. *Biomacromolecules*, 11(3), 549-554.
- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., & Rolland, A. P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of controlled release*, 56(1), 259-272.
- Maeda, Y., Jayakumar, R., Nagahama, H., Furuike, T., & Tamura, H. (2008). Synthesis, characterization and bioactivity studies of novel β -chitin scaffolds for tissue-engineering applications. *International journal of biological macromolecules*, 42(5), 463-467.
- Malmo, J., Sørgård, H., Vårum, K. M., & Strand, S. P. (2012). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *Journal of controlled release*, 158(2), 261-268.
- Manciu, L., Chang, X. B., Riordan, J. R., & Ruysschaert, J. M. (2000). Multidrug resistance protein MRP1 reconstituted into lipid vesicles: secondary structure and nucleotide-induced tertiary structure changes. *Biochemistry*, 39(42), 13026-13033.
- Mao, H. Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., . . . Leong, K. W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of controlled release*, 70(3), 399-421.
- Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 12-27.
- Marques, J. T., Devosse, T., Wang, D., Zamanian-Daryoush, M., Serbinowski, P., Hartmann, R., . . . Williams, B. R. (2006). A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 24(5), 559-565.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4), 607-620.
- McArthur, H. L., & Hudis, C. A. (2007). Dose-dense therapy in the treatment of early-stage breast cancer: an overview of the data. *Clinical breast cancer*, 8 6-10.
- McDevitt, C. A., & Callaghan, R. (2007). How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? *Pharmacology & therapeutics*, 113(2), 429-441.

- Meschini, S., Calcabrini, A., Monti, E., Del Bufalo, D., Stringaro, A., Dolfini, E., & Arancia, G. (2000). Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *International journal of cancer*, 87(5), 615-628.
- Miglietta, A., Panno, M. L., Bozzo, F., Gabriel, L., & Bocca, C. (2004). Insulin can modulate MCF-7 cell response to paclitaxel. *Cancer letters*, 209(2), 139-145.
- Milyavsky, M., Tabach, Y., Shats, I., Erez, N., Cohen, Y., Tang, X., . . . Goldfinger, N. (2005). Transcriptional programs following genetic alterations in p53, INK4A, and H-Ras genes along defined stages of malignant transformation. *Cancer research*, 65(11), 4530-4543.
- Mittendorf, E. A., Buchholz, T. A., Tucker, S. L., Meric-Bernstam, F., Kuerer, H. M., Gonzalez-Angulo, A. M., . . . Yi, M. (2013). Impact of chemotherapy sequencing on local-regional failure risk in breast cancer patients undergoing breast-conserving therapy. *Annals of surgery*, 257(2), 173-179.
- Mitnacht, U., Hartmann, H., Hein, S., Oliveira, H., Dong, M., P. Pêgo, A., . . . Schlosshauer, B. (2010). Chitosan/siRNA nanoparticles biofunctionalize nerve implants and enable neurite outgrowth. *Nano letters*, 10(10), 3933-3939.
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., & Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life sciences*, 76(13), 1439.
- Monsuez, J.-J., Charniot, J.-C., Vignat, N., & Artigou, J.-Y. (2010). Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International journal of cardiology*, 144(1), 3-15.
- Morjani, H., Aouali, N., Belhoussine, R., Veldman, R. J., Levade, T., & Manfait, M. (2001). Elevation of glucosylceramide in multidrug-resistant cancer cells and accumulation in cytoplasmic droplets. *International journal of cancer*, 94(2), 157-165.
- Motomura, S., Motoji, T., Takanashi, M., Wang, Y. H., Shiozaki, H., Sugawara, I., . . . Kanda, N. (1998). Inhibition of P-glycoprotein and recovery of drug sensitivity of human acute leukemic blast cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense oligonucleotides. *Blood*, 91(9), 3163-3171.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., . . . Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development*, 16(6), 720-728.
- Müller, R. H. (1991). *Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting: Modification, characterization and in vivo distribution*: Taylor & Francis US.
- Mumper, R., Wang, J., Claspell, J., & Rolland, A. (1995). *Novel polymeric condensing carriers for gene delivery*. Communication présentée à Proceedings of the international symposium on controlled release bioactive materials (vol. 22, p. 178-179).
- Mumper, R., Wang, J., Claspell, J., & Rolland, A. (1995). *Novel polymeric condensing carriers for gene delivery*. Communication présentée à Proc. Intl. Symp. Controlled Rel. Bioact. Mater (vol. 22, p. 178-179).
- Nagata, J., Kijima, H., Hatanaka, H., Asai, S., Miyachi, H., Abe, Y., . . . Mine, T. (2002). Reversal of drug resistance using hammerhead ribozymes against multidrug resistance-

- associated protein and multidrug resistance 1 gene. *International journal of oncology*, 21(5), 1021.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M. F., & Mao, Q. (2010). Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Current drug metabolism*, 11(7), 603.
- Nieth, C., Priebsch, A., Stege, A., & Lage, H. (2003). Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS letters*, 545(2), 144-150.
- Nimesh, S., Thibault, M. M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Molecular biotechnology*, 46(2), 182-196.
- Nishikura, K. (2001). A Short Primer on RNAi-RNA-Directed RNA Polymerase Acts as a Key Catalyst. *Cell*, 107(4), 415-418.
- No, H. K., & Meyers, S. P. (1989). Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 580-583.
- Nykänen, A., Haley, B., & Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3), 309-321.
- Oliveira, H., Pires, L. R., Fernandez, R., Martins, M. C. L., Simões, S., & Pêgo, A. P. (2010). Chitosan-based gene delivery vectors targeted to the peripheral nervous system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(3), 801-810.
- Omidi, Y., Hollins, A. J., Benboubetra, M., Drayton, R., Benter, I. F., & Akhtar, S. (2003). Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy: a microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells. *Journal of drug targeting*, 11(6), 311-323.
- Omidi, Y., Hollins, A. J., Drayton, R., & Akhtar, S. (2005). Polypropylenimine dendrimer-induced gene expression changes: the effect of complexation with DNA, dendrimer generation and cell type. *Journal of drug targeting*, 13(7), 431-443.
- Ong, S. T., Li, F., Du, J., Tan, Y. W., & Wang, S. (2005). Hybrid cytomegalovirus enhancer-h1 promoter-based plasmid and baculovirus vectors mediate effective RNA interference. *Human gene therapy*, 16(12), 1404-1412.
- Ozben, T. (2006). Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS letters*, 580(12), 2903-2909.
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., & Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7), 581-593.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2004). Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY-CLIFTON THEN TOTOWA-*, 265 85-100.
- Pakunlu, R. I., Wang, Y., Saad, M., Khandare, J. J., Starovoytov, V., & Minko, T. (2006). *In vitro* and *in vivo* intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *Journal of controlled release*, 114(2), 153-162.

- Patel, N. R., Pattni, B. S., Abouzeid, A. H., & Torchilin, V. P. (2013). Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 65(13), 1748-1762.
- Pawlak, T. M., & Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 59(4), 928-942.
- Pebernard, S., & Iggo, R. D. (2004). Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation*, 72(2-3), 103-111.
- Peniston, Q. P., & Johnson, E. L. (1980). Process for the manufacture of chitosan: Google Patents.
- Pennock, G. D., Dalton, W. S., Roeske, W. R., Appleton, C. P., Mosley, K., Plezia, P., . . . Salmon, S. E. (1991). Systemic toxic effects associated with high-dose verapamil infusion and chemotherapy administration. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(2), 105-110.
- Piao, X., Zhang, X., Wu, L., & Belasco, J. G. (2010). CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Molecular and cellular biology*, 30(6), 1486-1494.
- Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna*, 11(12), 1753-1761.
- Pillé, J. Y., Li, H., Blot, E., Bertrand, J. R., Pritchard, L. L., Opolon, P., . . . Soria, J. (2006). Intravenous delivery of anti-RhoA small interfering RNA loaded in nanoparticles of chitosan in mice: safety and efficacy in xenografted aggressive breast cancer. *Human gene therapy*, 17(10), 1019-1026.
- Potter, A. J., & Rabinovitch, P. S. (2005). The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 572(1), 27-44.
- Raghu, G., Park, S., Roninson, I., & Mechettner, E. (1996). Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, an MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes. *Experimental hematology*, 24(10), 1258.
- Rahman, A., Carmichael, D., Harris, M., & Roh, J. K. (1986). Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer research*, 46(5), 2295-2299.
- Ramachandra, M., Ambudkar, S. V., Chen, D., Hrycyna, C. A., Dey, S., Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1998). Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry*, 37(14), 5010-5019.
- Ramachandran, C., & Wellham, L. L. (2003). Effect of MDR1 phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in multidrug-resistant human tumor cell lines and xenografts. *Anticancer research*, 23(3), 2681-2690.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 23-36.

- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., & Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), 621-630.
- Redmond Jr, D. E. (1970). Tobacco and cancer: the first clinical report, 1761. *The New England journal of medicine*, 282(1), 18.
- Retief, F. P., & Cilliers, L. (2011). Breast cancer in antiquity. *SAMJ: South African Medical Journal*, 101(8), 513-515.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., & Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology*, 22(3), 326-330.
- Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan-DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as PEI. *Biomacromolecules*.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.
- Robbins, M., Judge, A., & MacLachlan, I. (2009). siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides*, 19(2), 89-102.
- Rojanarata, T., Opanasopit, P., Techapornkul, S., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2008). Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharmaceutical research*, 25(12), 2807-2814.
- Romøren, K., Pedersen, S., Smistad, G., Evensen, Ø., & Thu, B. J. (2003). The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *International journal of pharmaceutics*, 261(1), 115-127.
- Rudland, P., Fernig, D., & Smith, J. (1995). Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 49(9), 389-399.
- Sanger, F., & Coulson, A. (1978). *The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing*: FEB.
- Sato, T., Ishii, T., & Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22(15), 2075-2080.
- Sauna, Z. E., & Ambudkar, S. V. (2000). Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2515-2520.
- Savage, J. R. K. (1984). Radiation-Induced Chromosome Damage in Man. *International Journal of Radiation Biology*, 46(5), 654-654.
- Schiffelers, R. M., Ansari, A., Xu, J., Zhou, Q., Tang, Q., Storm, G., . . . Woodle, M. C. (2004). Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic acids research*, 32(19), e149-e149.
- Schiffelers, R. M., Woodle, M. C., & Scaria, P. (2004). Pharmaceutical prospects for RNA interference. *Pharmaceutical research*, 21(1), 1-7.
- Schipper, N. G., Olsson, S., Hoogstraate, J. A., Vårum, K. M., & Artursson, P. (1997). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical research*, 14(7), 923-929.

- Schottenfeld, D., & Fraumeni, J. F. (2006). *Cancer epidemiology and prevention*: Oxford University Press, USA.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., . . . Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7(1), 3.
- Schubert, S., Grünweller, A., Erdmann, V. A., & Kurreck, J. (2005). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *Journal of molecular biology*, 348(4), 883-893.
- Schuldes, H., Dolderer, J., Zimmer, G., Knobloch, J., Bickeböller, R., Jonas, D., & Woodcock, B. (2001). Reversal of multidrug resistance and increase in plasma membrane fluidity in CHO cells with R-verapamil and bile salts. *European Journal of Cancer*, 37(5), 660-667.
- Semple, S. C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A. P., Mui, B. L., Cho, C. K., . . . Hafez, I. M. (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature biotechnology*, 28(2), 172-176.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587), 983-985.
- Senior, A. E., & Bhagat, S. (1998). P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry*, 37(3), 831-836.
- Seymour, L. (1991). Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 9(2), 135-187.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10(2), 37-51.
- Shapiro, A. B., & Ling, V. (1995). Using purified P-glycoprotein to understand multidrug resistance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 27(1), 7-13.
- Shin, C., Nam, J. W., Farh, K. K. H., Chiang, H. R., Shkumatava, A., & Bartel, D. P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular cell*, 38(6), 789-802.
- Shukla, S., Ohnuma, S., & Ambudkar, S. (2011). Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Current drug targets*, 12(5), 621.
- Shukla, S., Sumaria, C. S., & Pradeepkumar, P. (2010). Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem*, 5(3), 328-349.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., . . . Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107(4), 465-476.
- Silva, J. M., Li, M. Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M. C., Rickles, R. J., . . . Schlabach, M. R. (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature genetics*, 37(11), 1281-1288.

- Sledz, C. A., Holko, M., De Veer, M. J., Silverman, R. H., & Williams, B. R. G. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature cell biology*, 5(9), 834-839.
- Sørensen, D. R., Leirdal, M., & Sioud, M. (2003). Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *Journal of molecular biology*, 327(4), 761-766.
- Soule, H., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., . . . Harborth, J. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *nature*, 432(7014), 173-178.
- Štefková, J., Poledne, R., & Hubáček, J. (2004). ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, 53 235-243.
- Steinherz, L. J., Steinherz, P. G., Tan, C. T. C., Heller, G., & Murphy, M. L. (1991). Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 266(12), 1672-1677.
- Stierle, V., Laigle, A., & Jolles, B. (2007). Modulation of the efficiency of a siRNA directed against *MDR1* expression in MCF7-R cells when combined with a second siRNA. *Biochimie*, 89(8), 1033-1036.
- Stierlé, V., Laigle, A., & Jollès, B. (2005). Modulation of *MDR1* gene expression in multidrug resistant MCF7 cells by low concentrations of small interfering RNAs. *Biochemical pharmacology*, 70(10), 1424-1430.
- Stoecklein, N. H., & Klein, C. A. (2010). Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *International journal of cancer*, 126(3), 589-598.
- Strand, S. P., Issa, M. M., Christensen, B. E., Vårum, K. M., & Artursson, P. (2008). Tailoring of chitosans for gene delivery: novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties. *Biomacromolecules*, 9(11), 3268-3276.
- Suggate, E. L., Ahmed, Z., Read, M. L., Eaton-Charnock, K., Douglas, M. R., Gonzalez, A.-M., . . . Logan, A. (2009). Optimisation of siRNA-mediated RhoA silencing in neuronal cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 40(4), 451-462.
- Suhorutsenko, J., Oskolkov, N., Arukuusk, P., Kurrikoff, K., Eriste, E., Copolovici, D.-M., & Langel, U. I. (2011). Cell-penetrating peptides, PepFects, show no evidence of toxicity and immunogenicity in vitro and in vivo. *Bioconjugate chemistry*, 22(11), 2255-2262.
- Sui, H., Fan, Z., & Li, Q. (2012). Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *Journal of International Medical Research*, 40(2), 426-435.
- Swain, S. M., Jeong, J.-H., Geyer Jr, C. E., Costantino, J. P., Pajon, E. R., Fehrenbacher, L., . . . Erban, J. K. (2010). Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 362(22), 2053-2065.

- Tabata, Y., & Ikada, Y. (1988). Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo-and copolymers. *Journal of biomedical materials research*, 22(10), 837-858.
- Takahara, H., & Sinohara, H. (1982). Mouse plasma trypsin inhibitors. Isolation and characterization of alpha-1-antitrypsin and contrapsin, a novel trypsin inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 257(5), 2438-2446.
- Takemura, G., & Fujiwara, H. (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in cardiovascular diseases*, 49(5), 330-352.
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, 70(14), 5649-5669.
- Tannock, I. F., & Hill, R. P. (1998). *The basic science of oncology*: McGraw-Hill New York:.
- Techaarpornkul, S., Wongkupasert, S., Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Nunthanid, J., & Ruktanonchai, U. (2010). Chitosan-mediated siRNA delivery in vitro: effect of polymer molecular weight, concentration and salt forms. *AAPS PharmSciTech*, 11(1), 64-72.
- Thermoscientific. (2008). Tiré de <http://www.thermoscientific.de>
- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Molecular Therapy*, 18(10), 1787-1795.
- Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer control*, 10(2), 159-159.
- Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & development*, 19(5), 517-529.
- Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 131-135.
- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369-7375.
- Tuschl, T., & Borkhardt, A. (2002). Small interfering RNAs. *Mol. Intervent*, 2 158-167.
- Uchida, M., Li, X. W., Mertens, P., & Alpar, H. O. (2009). Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(8), 754-764.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., & Aigner, A. (2004). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene therapy*, 12(5), 461-466.
- Van de Water, F. M., Boerman, O. C., Wouterse, A. C., Peters, J. G. P., Russel, F. G. M., & Masereeuw, R. (2006). Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug metabolism and disposition*, 34(8), 1393-1397.

- Vaysse, L., Burgelin, I., Merlio, J. P., & Arveiler, B. (2000). Improved transfection using epithelial cell line-selected ligands and fusogenic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1475(3), 369-376.
- Verma, A., & Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small*, 6(1), 12-21.
- Verma, U. N., Surabhi, R. M., Schmaltieg, A., Becerra, C., & Gaynor, R. B. (2003). Small interfering RNAs directed against β -catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clinical cancer research*, 9(4), 1291-1300.
- Veronesi, U. (1977). Conservative treatment of breast cancer: A trial in progress at the Cancer Institute of Milan. *World journal of surgery*, 1(3), 324-326.
- Veronesi, U., Saccozzi, R., Del Vecchio, M., Banfi, A., Clemente, C., De Lena, M., . . . Marubini, E. (1981). Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *New England Journal of Medicine*, 305(1), 6-11.
- Vonderheid, E. C. (2003). Treatment planning in cutaneous T-Cell lymphoma. *Dermatologic therapy*, 16(4), 276-282.
- Waechter, C., Pelech, S., Flynn, A., Proud, C., FEBS, L., Frederickson, R., . . . Rhoads, R. (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., & Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13959-13964.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., & Finnegan, E. J. (2001). Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci*, 6(7), 297-301.
- Watts, J. K., Deleavy, G. F., & Damha, M. J. (2008). Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug discovery today*, 13(19), 842-855.
- Weiss, R. B. (1992). *The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?* Communication présentée à Seminars in oncology (vol. 19, p. 670).
- Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(2), 129-138.
- Wienholds, E., & Plasterk, R. H. A. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS letters*, 579(26), 5911-5922.
- Wind, N., & Holen, I. (2011). Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies. *International journal of breast cancer*, 2011.
- Wu, H., Hait, W. N., & Yang, J.-M. (2003). Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Research*, 63(7), 1515-1519.
- Wu, H., Hait, W. N., & Yang, J. M. (2003). Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer research*, 63(7), 1515-1519.

[www.cancer.ca.\).](http://www.cancer.ca.)

- Wyllie, A. (1993). Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *British journal of cancer*, 67(2), 205.
- Xiao, H., Wu, Z., Shen, H., Luo, A. L., Yang, Y. F., Li, X. B., & Zhu, D. Y. (2008). In vivo Reversal of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance by Efficient Delivery of StealthTM RNAi. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 103(4), 342-348.
- Xie, F. Y., Woodle, M. C., & Lu, P. Y. (2006). Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug discovery today*, 11(1-2), 67.
- Xu, L., & Anchordoquy, T. (2011). Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: Challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(1), 38-52.
- Xu, S., Dong, M., Liu, X., Howard, K. A., Kjems, J., & Besenbacher, F. (2007). Direct force measurements between siRNA and chitosan molecules using force spectroscopy. *Biophysical journal*, 93(3), 952-959.
- Yassin, A. E. B., Albekairy, A., Alkatheri, A., & Sharma, R. K. (2013). ANTICANCER-LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES: HIGH POTENTIAL ADVANCEMENT IN CHEMOTHERAPY. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 8(2).
- Yiu, S., Wong, P. W. H., Lam, T., Mui, Y., Kung, H., Lin, M., & Cheung, Y. (2005). Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics*, 21(2), 144-151.
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna*, 8(7), 855-860.
- Zhang, Z., Wu, J. Y., Hait, W. N., & Yang, J. M. (2004). Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination. *Molecular pharmacology*, 66(3), 395-403.
- Zhong, Y., Wei, J., Fu, Y., Shao, J., Liang, Y., Lin, Y., . . . Zhu, Z. (2008). Toxicity of cationic liposome Lipofectamine 2000 in human pancreatic cancer Capan-2 cells]. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 28(11), 1981.
- Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Evans, B. R., Medina, D. J., Liu, C. G., & Yang, J. M. (2008). Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR 1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 76(5), 582-588.
- Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., . . . John, M. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *nature*, 441(7089), 111-114.
- Zintchenko, A., Philipp, A., Dehshahri, A., & Wagner, E. (2008). Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjugate chemistry*, 19(7), 1448-1455.
- Zunino, F., Gambetta, R., Di Marco, A., & Zaccara, A. (1972). Interaction of daunomycin and its derivatives with DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 277(3), 489-498.