



Université Claude Bernard



Lyon 1

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **1^{er} juillet 2021**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame ZAGKOU Stavroula**

Titre de la thèse :

Conception et évaluation de particules thérapeutiques modulant l'autophagie



Résumé

En 2016, le professeur Yoshinori Ohsumi a reçu le prix Nobel de physiologie et de médecine pour sa découverte, au début des années 1990, des gènes *ATG* (*autophagy-related*) qui contrôlent la macroautophagie, une forme d'autophagie qui peut dégrader des macromolécules et des structures cytoplasmiques. L'autophagie est un processus d'autodigestion durant lequel les cellules dégradent leurs propres composants afin de maintenir l'homéostasie en conditions basale. Des dysfonctionnements de l'autophagie sont associés à de nombreuses pathologies allant du cancer aux maladies neurodégénératives en passant par le diabète de type II, les maladies infectieuses et les maladies auto-immunes, ainsi que le vieillissement. Cibler l'autophagie constitue donc une nouvelle voie de recherche thérapeutique.

À l'heure actuelle, les essais cliniques menés utilisent essentiellement la chloroquine, ou ses dérivés, qui bloque l'autophagie pour le traitement du cancer. Cependant la chloroquine et ses dérivés agissent sur tous les compartiments intracellulaires acides et ont beaucoup d'effets secondaires, non-spécifiques de l'autophagie. D'autres modulateurs de l'autophagie ont été décrits, comme Rapamycine, PP242 ou Torin 1 qui toutes trois induisent l'autophagie par inhibition de mTOR. Une nouvelle fois cependant, cette sérine/thréonine kinase est à la croisée de nombreuses régulations intracellulaires telles que la croissance, la prolifération ou la survie cellulaire. Toute action sur cette voie de signalisation peut engendrer de nombreux effets secondaires indépendants de l'autophagie. Récemment, un peptide tat-beclin L11 a été désigné et évalué *in vitro* et *in vivo*. Tat-Beclin (T-B) est un peptide de 24 acides aminés composé d'une séquence de pénétration cellulaire *Tat* et d'une séquence dérivée de *BECN1* (beclin 1). *BECN1* est une protéine impliquée dans l'autophagie en tant que composant du complexe 1 de la phosphatidylinositol 3-kinase de classe III. La cible moléculaire du peptide T-B est GAPR-1/GLIPR2 (Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1). Il est proposé que le peptide Tat-Beclin favorise la libération de *BECN1* du Golgi, où elle inactive l'autophagie, vers des compartiments subcellulaires non golgiens, ce qui entraîne une formation précoce accrue d'autophagosomes. C'est un des meilleurs agents inducteurs de l'autophagie disponible, notamment parce qu'il est très spécifique de cette voie d'activation, ce qui limite ses potentiels effets secondaires.

La modulation de l'autophagie est évaluée comme stratégie thérapeutique dans le cancer, pour traiter les maladies neurodégénératives, prolonger la durée de vie, ou dans des conditions métaboliques altérés de façon chronique. La maladie du foie gras non-alcoolique (NAFLD en anglais) qui peut évoluer en stéatose hépatique non-alcoolique (NASH) est la cause majeure de maladie chronique du foie dans le monde. Elle se caractérise par l'accumulation de graisses dans le foie à cause d'une hyperglycémie chronique, principalement à cause d'un diabète mal contrôlé, d'une obésité et de la sédentarité. La NASH (qui concerne 10 à 30% des personnes atteintes de NAFLD) peut évoluer vers un fibrome puis une cirrhose (10 à 15% des personnes atteintes de NASH) et cancer hépatiques. Cette maladie est en pleine expansion à cause de l'augmentation du nombre de personnes atteintes d'obésité et de diabète, avec une prévalence moyenne estimée à 24% de la population, soit 12% en Afrique et jusqu'à 30% en Amérique du Sud et Moyen-Orient (chiffres 2018). D'un point de vue clinique, cette pathologie se caractérise par une accumulation de graisse dans le foie, une oxydation, une inflammation chronique et une fibrose. Aux stades avancés de la maladie, une greffe peut s'avérer nécessaire, et il n'y a à l'heure actuelle, aucun traitement médicamenteux. Un régime alimentaire plus équilibré et la reprise d'une activité physique permettent une stabilisation aux stades précoces de la maladie.

L'activation de l'autophagie dans le foie est une piste thérapeutique, notamment via la lipophagie ciblant les lipides accumulés dans les hépatocytes. Cependant, l'autophagie peut avoir des rôles opposés selon les cellules visées. Par exemple, l'induction de l'autophagie dans les hépatocytes (lipophagie permettant de réduire la lipotoxicité) ou les macrophages

(permettant de limiter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires) peut être bénéfique, mais l'activation de l'autophagie dans les cellules stellaires peut être délétère et favoriser la survenue de fibroses. Par conséquent, l'induction ciblée de l'autophagie dans des cellules spécifiques est nécessaire.

Les administrations ciblées de principes actifs dans des organes ou cellules spécifiques sont aujourd'hui envisageables grâce à la nanomédecine. Les nanoparticules sont en effet des vecteurs permettant d'améliorer des traitements thérapeutiques, tout en réduisant leur toxicité. Ces particules sont très variables et personnalisables en terme :

- de composition : lipidique, polymérique ou inorganique ;
- de structure : liposomale, en micelle, sphérique, en capsule ;
- de taille : micrométrique ou nanométrique ;
- de charge de surface : neutre, cationique ou anionique ;
- de rugosité : surface lisse, rugueuse, chevelue ;
- etc.

Pour un usage biomédical, des particules biodégradables seront préférées. Pour cela, il est possible de recourir à des structures lipidiques telles que les liposomes, mais qui ont l'inconvénient de ne pas être très stables d'un point de vue colloïdal. Les particules polymériques à base de polymère aliphatique polyester poly(acide lactique), PLA ou de poly(acide lactique-co-glycolique), PLGA combinent de nombreux avantages. En effet, ces polymères sont biodégradables *in situ* par hydrolyse des liaisons ester. Il est possible de produire des particules aux propriétés physico-chimiques modulables à façon, permettant de s'adapter au principe actif vectorisé et à l'application thérapeutique. Enfin, les méthodes de production sont bien maîtrisées, permettant un développement clinique et industriel.

Adjuvatis, société de biotechnologie lyonnaise issue du CNRS, a développé un système de délivrance de principe actif, des particules de PLA de 200 nm de diamètre environ, capables de transporter des molécules spécifiquement dans le foie, lorsqu'elles sont injectées par voie intra-veineuse. Les cellules de Kupfer et des hépatocytes sont responsables de cette capture de particules. Ce système est donc idéal pour le traitement des maladies chroniques du foie, notamment la NAFLD/NASH.

Ce projet de thèse financé par Les Actions Marie Skłodowska-Curie (A.M.S.C.) - Horizon 2020, dans le cadre d'un réseau européen de formation sur la recherche appliquée en autophagie (DRIVE, No 765912) a été réalisé au sein de la société Adjuvatis et du Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie thérapeutique (LBTI), tous deux à Lyon. L'objectif de ce projet consiste à moduler l'autophagie de façon ciblée dans le foie, comme stratégie thérapeutique pour la NAFLD. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la combinaison du peptide Tat-Beclin L11, inducteur spécifique de l'autophagie, avec des particules polymériques utilisées comme système d'administration de médicaments biodégradables renforcerait son action d'amélioration de l'autophagie, à une dose plus faible, et faciliterait le ciblage des médicaments *in vivo*. Pour cela, nous avons tout d'abord développé et caractérisé des formulations du peptide Tat-Beclin L11 avec les particules développées par Adjuvatis, par adsorption de ce peptide cationique à leur surface chargée négativement. Des formulations ont également été développées avec le peptide contrôle Tat-Beclin L11s (scramble). Ces formulations ont ensuite été évaluées *in vitro* pour leur capacité à induire l'autophagie dans plusieurs types cellulaires, notamment par western blot et microscopie électronique à transmission. En outre, nous avons examiné le potentiel thérapeutique de ce système dans un modèle *in vitro* de NAFLD, qui a été développé et caractérisé dans deux types cellulaires. Les formulations préalablement développées ont été évaluées pour leur capacité à réduire la stéatose en suivant le nombre et la taille des gouttelettes lipidiques intracellulaires par microscopie de fluorescence. Enfin, la

biodistribution de ces formulations, et leur capacité de ciblage du foie et de rétention dans cet organe ont été évaluées *in vivo* chez des souris saines et obèses, en utilisant des particules marquées avec un fluorochrome proche infra-rouge, et la tomographie de fluorescence.

Conception et caractérisation de particules induisant l'autophagie.

Les particules de poly(acide lactique) produites sans tensio actif ni stabilisant ont été utilisées comme vecteur biodégradable du peptide Tat-Beclin L11, adsorbé à leur surface. Les particules ainsi produites ont un diamètre d'environ 200 nm, et une bonne homogénéité en taille, caractérisé par une valeur d'indice de polydispersité faible, tel que mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les observations en microscopie électronique à balayage confirment ces mesures, et ne mettent pas en évidence de grande différence avec les particules non-formulées. En revanche, les mesures de potentiel Zeta marquent une différence entre les particules « nues » et anioniques, et les particules avec le peptide en surface, qui sont alors chargées positivement.

Évaluation de la modulation de l'autophagie et du flux autophagique *in vitro* dans les cellules HeLa et HepG2. Evaluation *in vitro* d'efficacité thérapeutique.

Les formulations (NP T-B) ont été évaluées *in vitro* pour leur capacité à moduler l'autophagie, par diverses méthodes telles que l'analyse en western blot des marqueurs LC3-II et p62 en fonction du temps, en comparaison avec le peptide non formulé, et des formulations avec le peptide non-fonctionnel. Dans les cellules HeLa, les NP T-B ont modulé l'autophagie de manière accrue et soutenue et à une dose plus faible que le peptide soluble Tat-Beclin. Des expériences de flux autophagique dans deux lignées cellulaires ont confirmé que NP T-B induit l'autophagie. Les cellules HeLa traitées avec les NP T-B et observées par microscopie électronique à transmission a révélé que les NP T-B s'accumulent dans les compartiments endosomaux et autolysosomiaux.

Enfin, dans un modèle *in vitro* de NAFLD, les NP T-B ont réduit le nombre de gouttelettes lipidiques à une dose plus faible que la T-B.

Etude de biodistribution *in vivo* chez les souris SKH1 (saine) et ob/ob (obèses).

Des particules contenant un fluorochrome proche infra-rouge encapsulé, formulées ou non avec le peptide Tat-Beclin, ont été utilisées pour suivre leur biodistribution après injection intra veineuse dans deux modèles de souris :

- des souris SKH1, saines et immunocompétentes mais dépourvues de poils, ce qui permet d'optimiser les observations par tomographie de fluorescence et le suivi cinétique quantitatif de la fluorescence,
- des souris mutées ob/ob [B6.Cg-Lepob/J (ob/ob)], qui n'expriment plus la leptine et se nourrissent donc excessivement. C'est un modèle de souris obèse reconnu pour l'étude des maladies du foie gras.

Le ciblage hépatique de la NP T-B a été observé chez des souris saines SKH1 et obèses (ob/ob). Une rétention des particules dans cet organe a pu être observé pendant au moins 7 jours dans les souris saines, suggérant une libération soutenue du fluorochrome encapsulé, tandis que le signal fluorescent correspondant au fluorophore injecté sous forme soluble avait disparu moins de 48h après son administration. Pour des raisons expérimentales, la fluorescence n'a pas été mesurée plus de trois jours chez les souris obèses, mais un profil similaire de biodistribution et de rétention a été observé. Ces résultats démontrent la pertinence de ce modèle de particules pour une délivrance ciblée d'actifs dans le foie.

Lors de ce travail de thèse, nous avons développé un système biodégradable de délivrance du peptide Tat-Beclin L11, et démontré leur capacité à activer l'autophagie dans deux modèles cellulaires, avec des concentrations de peptide dix fois plus faibles que lorsqu'il est

utilisé sous forme libre. Dans un modèle *in vitro* de NAFLD, les formulations peptidiques ont permis de réduire de façon significative le nombre de gouttelettes lipidiques intracellulaires. Enfin, des études cinétiques de biodistribution conduites *in vivo* en corps entier par tomographie de fluorescence ont mis en évidence la capacité des particules formulées ou non à cibler le foie, chez des souris saines ou obèses. Ainsi, ces particules induisant l'autophagie pourraient être un candidat intéressant étudié plus avant comme stratégie thérapeutique pour la NAFLD et nécessitera des études fonctionnelles supplémentaires.