



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **14 juin 2023**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur GENEDY Hussein**

Titre de la thèse : « *Nanoparticules de chitosane pour la délivrance de micro-ARN en vue de la régénération du muscle cardiaque* »

Résumé



Mes travaux de recherche s'inscrivent dans le cadre du programme européen MSCA/H2020 Train-Heart ayant pour objet la régénération du muscle cardiaque après infarctus, en utilisant des micro-ARNs (miARNs) pour stimuler la prolifération des cardiomyocytes (CMs). En d'autres termes, les miARNs doivent être délivrés aux CMs et libérés dans le cytoplasme de ces cellules pour induire leur prolifération et donc la régénération du muscle cardiaque.

La délivrance ciblée des miARNs est difficile car ils sont rapidement dégradés dans les fluides biologiques, des nanovecteurs sont donc nécessaires pour les protéger et les délivrer là où c'est nécessaire. Ces nanovecteurs doivent, bien sûr, être efficaces et sans risque pour les patients. Différents types d'agents de délivrance peuvent être envisagés soit d'origine virale, soit des nanovecteurs synthétiques. Mon projet de recherche avait pour objectif de mettre au point un système de nanovecteurs à base de polysaccharides pour les miARNs thérapeutiques. Dans ce contexte, "sans risque" signifie exclure toute matière première potentiellement dangereuse et développer des procédés de formulation basés sur le concept de chimie verte.

Un polysaccharide très intéressant utilisé dans l'élaboration de divers nanovecteurs est le chitosane (CS), un polymère naturel, biodégradable et biocompatible. Le chitosane est un copolymère d'unités glucosamine et N-acétyl glucosamine. La fraction molaire des unités N-acétyl glucosamine au sein des chaînes de polymère est appelée degré d'acétylation (DA). C'est un paramètre intrinsèque majeur des macromolécules de CS, avec la masse molaire. Ainsi, étant cationique, le CS peut facilement former des particules avec des polymères anioniques tels que des acides nucléiques par exemple. J'ai effectué une recherche documentaire approfondie axée sur l'utilisation du CS comme matrice "sans risque" pour obtenir des nanovecteurs pour les micro-ARNs. Ce travail a été publié sous forme d'article de synthèse (review). J'ai fait le tour de toutes les formulations associant CS et miARN étudiées au cours des 10 dernières années, afin de pouvoir mettre en évidence leurs différences en termes de

matériaux, de procédés de formulation et d'applications prévues. Les facteurs qui ont rendu certains systèmes supérieurs à leurs prédécesseurs ont également été discutés.

Ainsi, les nanoparticules de CS (NPs de CS) pourraient fournir une alternative bon marché, durable et « plus sûr » que les systèmes de délivrance de gènes par vecteurs viraux. Pour atteindre la même efficacité que les vecteurs viraux, de nouvelles recherches sont nécessaires en s'appuyant sur les résultats les plus récents, les mieux établis et/ou standardisés concernant l'élaboration de nanovecteurs efficaces de miARN à base de CS. Efficace veut dire biologiquement actif et suffisamment stable pour protéger le miARN de l'environnement extracellulaire, atteindre les cellules ciblées, être internalisé et avoir une énergie de liaison avec les brins de miARN suffisamment faible pour pouvoir les libérer dans le cytoplasme des cellules ciblées.

Une comparaison systématique de différents facteurs (masse molaire du DS, degré d'acétylation du CS, concentration en polymère dans les nanoparticules, mode d'addition du polyanion, rapport molaire de charge (charges positives /charges négatives), ajout d'agent de ciblage...) dans la même étude est nécessaire pour parvenir à un consensus valide. L'utilisation d'un CS de masse molaire de 10 kg.mol^{-1} au moins, un $DA \leq 30 \%$, un rapport molaire de charges compris entre 1.5 et 20 et la possibilité de greffer des ligands si nécessaire constituent de bons points de départ pour débiter des études. Selon les applications prévues, l'ajout d'autres composants aux formulations (comme les polyanions naturels) peut apporter des caractéristiques supplémentaires à celles du chitosane.

En se basant sur les travaux de la littérature, ma stratégie de recherche a pris en compte le fait qu'une étude systématique était indispensable et que, pour être potentiellement développé, un nanovecteur doit :

- être facile à fabriquer,
- avoir une taille proche ou inférieure à 200 nm, afin d'éviter l'activation du système réticulo-endothélial et être éliminé rapidement de l'organisme,
- supporter un protocole de stérilisation,
- être stable dans le temps, pour simplifier la logistique (le stockage, la distribution, etc.),
- être en mesure de contenir la substance à délivrer ainsi qu'un potentiel agent de ciblage.

Ainsi, des lots de CS de différents DA s (29% (CS29), 38% (CS38) et 47% (CS47)) ont été obtenus par des protocoles bien établis au laboratoire. Certains lots de CS ont également été rendus fluorescents par couplage avec le FITC. L'élaboration de NPs de CS s'est basée sur la complexation polyélectrolyte qui a lieu par neutralisation de charges entre un polycation, le CS, et un polyanion. Dans ce travail, cette réaction a eu lieu à température ambiante, par mélange de solutions aqueuses de CS (le polycation) et de sulfate de dextrane (DS) (le polyanion). Ce processus a été appelé le « processus One shot ». Aucun chauffage, aucun cisaillement élevé, aucun tensioactif, ni solvant organique n'ont été utilisés, démontrant que les exigences d'un procédé vert étaient respectées. Les lots de sulfate de dextrane (DS) utilisés étaient de masses molaires variables de 9 (DS9), 20 (DS20) et 500 kg.mol^{-1} (DS500), utilisés soit seuls soit associés à l'acide nucléique à encapsuler. Les effets de la masse molaire du DS et du DA du chitosane ont été étudiés. Une augmentation de la masse molaire du DS n'a eu aucun impact significatif sur la taille des particules et leur potentiel zêta (ZP), tandis que l'augmentation du DA du CS a provoqué l'augmentation du diamètre moyen des particules : 270 nm pour CS29, environ 330 nm pour CS38 et environ 400 nm pour CS47.

J'ai étudié un deuxième procédé d'élaboration des particules : la méthode par dialyse basée sur l'utilisation d'un mélange de polyanion et de polycation dissouts en solution aqueuse de chlorure de sodium à la concentration de 2M, de façon à écranter les interactions électrostatiques et empêcher l'appariement polycation-polyanion. Ensuite, cette solution de polysaccharides a été dialysée pour éliminer le sel et permettre un appariement lent des deux partenaires. Dans ce procédé, l'impact de la masse molaire du DS sur la taille et la polydispersité des nanoparticules était plus important que dans le système "One shot" et seul le DS9 a permis d'obtenir des NPs de diamètres ~ 240 nm avec le CS38 et des NPs de diamètres ~ 200 nm avec le CS 47 (la taille la plus faible obtenue par la méthode de dialyse) avec à chaque fois un indice de polydispersité acceptable (Pdl) inférieur à 0,15.

Le troisième type de formulation que j'ai testé était les polyplexes, résultant de la complexation du CS avec l'acide nucléique à délivrer. Cette stratégie est la plus largement utilisée dans la littérature et j'ai étudié le rôle du *DA* du chitosane ainsi que celui du rapport de charge sur la taille des particules. Avec le CS 38, la variation du rapport molaire de charges de 3.2 à 25.6 n'a eu aucun effet sur la taille des particules (environ 160 nm) ni sur le ZP (environ +18 mV). L'augmentation du *DA* à 47 % a donné des polyplexes de plus petit diamètre (environ 81 nm) par rapport au *DA* 38 %, avec un ZP d'environ 17 mV.

Les NPs obtenues par complexation de polyélectrolytes via le procédé one-shot ont pu être conservées à température ambiante dans une solution aqueuse à 50 mM en NaCl à pH4 pendant un an sans altération des propriétés colloïdales de la dispersion. Le suivi dans le temps des NPs obtenues par dialyse a été fait sur 4 mois et demi sans mettre en évidence aucune altération de leurs propriétés. Ces deux résultats n'ont jamais été encore rapportés dans la littérature. De plus, les NPs de CS sont stables jusqu'à pH 7.8, ou également dans du NaCl 150 mM pH 6.5, ou dans du PBS. Enfin, ces nanoparticules peuvent être concentrées par centrifugation, ultra filtration et dialyse contre le PEG sans altération majeure de leurs propriétés colloïdales.

J'ai démontré que les particules de DS-CS pouvaient être chargées en un acide nucléique modèle (PdT) avec un rendement de chargement allant de 60% à 74% selon le protocole d'association et selon le *DA* du CS, avec une augmentation limitée de la taille des particules et une très petite diminution du ZP. Des résultats similaires ont été obtenus avec un PdT fluorescent. J'ai également montré que l'agent de ciblage sélectionné pour augmenter le temps de séjour des nanovecteurs dans le cœur, l'acide tannique (TA), un dérivé de polyphénol, pouvait être immobilisé à la surface des particules avec une efficacité de 43%.

Afin d'étudier l'organisation des NPs de complexes polyélectrolytes, j'ai observé par cryo-MET des échantillons de particules avec et sans PdT ainsi qu'avec ou sans acide tannique. Dans tous les cas, les particules issues du procédé "One-shot" étaient des assemblages de petites NPs élémentaires, d'environ 30 nm de diamètre. Cette organisation est maintenue même après ultrafiltration par centrifugation.

Pour envisager une utilisation ultérieure de mes nanoparticules pour des applications thérapeutiques, j'ai vérifié s'il était possible de les stériliser par stérilisation à la vapeur. Seule une faible diminution de taille a été observée après autoclavage des NPs de CS dans du NaCl 50 mM, qu'elles aient été chargées ou non en PdT et quel que soit le mode de chargement du PdT. De plus, le Pdl a significativement diminué, suggérant une distribution plus monodisperse. En revanche, les polyplexes ont montré une légère augmentation de taille, avec la même tendance à la baisse de la polydispersité qu'observée pour les CS-DS PEC. Ce sont des résultats très importants d'un point de vue

procédé, évitant la nécessité de réaliser l'ensemble de la fabrication des PEC dans des conditions stériles.

J'ai testé l'innocuité et l'efficacité de ces NPs avec le miARN thérapeutique (miR-199a-3p) obtenu auprès du consortium européen. Les études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Pr. L. De Windt à l'Université de Maastricht (MU) et celui du Pr. M. Giacca au King's College de Londres (KCL).

La cytocompatibilité des NPs de CS a été testée sur une lignée cellulaire de cardiomyocytes « HL-1 » d'abord, puis sur des cardiomyocytes néonataux de souris et de rat. Pour les cellules HL-1 et les CMs de rat, une viabilité de 100 % a été observée avec les NPs quel que soit le *DA* du CS. Les CMs de souris se sont avérées plus sensibles à la présence de NPs, avec une viabilité de 80 %. En présence de TA, la viabilité a diminué jusqu'à 50 %. Ensuite, j'ai étudié l'internalisation des particules comme première étape indispensable à leur efficacité. J'ai d'abord travaillé avec la lignée cellulaire de cardiomyocytes « HL-1 », puis sur des CMs primaires de rats néonataux (CMRNs). À cette fin, des NPs élaborées à partir de CS-FITC fluorescent ont été incubées pendant différentes durées avec des cellules HL-1 ou des CMRNs, dont le cytoplasme et les noyaux étaient colorés de manière adéquate. La microscopie confocale en faisant des « Z-stacking » (empilements en Z) s'est avérée la méthode la plus appropriée pour prouver l'internalisation des particules par les CMs et pour mettre en évidence leur localisation (cette technologie de pointe est décrite en détail dans le manuscrit.) Ainsi, en utilisant du CS-FITC, j'ai pu établir que plus le temps d'incubation des cellules avec mes NPs de CS était long, plus les NPs étaient internalisées et plus elles étaient proches du noyau. Ensuite, avec des NPs de CS-FITC chargées en miARN fluorescent, AlexaFluor647-miR-199a, l'actinine et les noyaux des cellules étant respectivement blanc et bleus, j'ai pu démontrer que les NPs restaient dans le cytoplasme des cellules. A la suite de ces résultats prometteurs, il était nécessaire de montrer que la prolifération des CMs pouvait être induite par le miR-199a délivré par mes NPs de chitosane. Par rapport aux cellules témoins n'ayant pas eu de nanoparticules, les NPs de CS ont permis une augmentation de la prolifération des CMs de 1.6 à 1.9 fois. Les polyplexes correspondants ont eux permis d'augmenter de 1.3 à 1.4 fois la prolifération des CM. Cependant, *in vitro*, la régulation négative (downregulation) des gènes cibles était plus élevée avec les polyplexes qu'avec les PEC de CS-DS.

La dernière étape de mon travail de doctorat a consisté à étudier *in vivo* la régulation négative des gènes ciblés et la sur-expression de miARN-199a-3p, après injection intracardiaque de mes NPs de CS chez des souris CD1 saines. Des nanoparticules de complexes polyélectrolytes CS-DS, tannylées ou non, ont induit environ 38 % de régulation négative de CLIC5. Les polyplexes non tannylés ont induit une régulation négative de 6 %, alors que leurs homologues tannylés ont atteint 48 %. Les PEC de CS-DS ont atteint un niveau relatif d'expression de miR-199a-3p environ 6 fois plus élevé que les groupes non traités. Les polyplexes de CS (tannylés ou non) ont atteint une surexpression jusqu'à 4 fois plus élevée.

En conclusion, ce projet m'a permis de démontrer que le procédé vert de complexation polyélectrolyte est efficace pour obtenir des nanovecteurs adaptés à la délivrance d'acides nucléiques. Ce procédé est peu coûteux, simple à mettre en œuvre et conduit à des nanovecteurs d'une stabilité exceptionnelle à température ambiante, dans certains cas plus d'un an. Le chargement en acide nucléique d'intérêt peut être réalisé soit par encapsulation, soit par sorption en surface, soit faire partie intégrante de la formulation ; puis un agent de ciblage, TA, peut être ajouté. La Cryo-TEM a permis d'étudier l'organisation structurale de ces nanovecteurs. J'ai pu établir que ces systèmes colloïdaux sont des assemblages de particules élémentaires d'environ 30 nm de diamètre. *In vitro*, ces nanovecteurs ne sont pas cytotoxiques. Ils sont internalisés et accumulés dans le cytoplasme, près des

noyaux des cellules. Enfin, ils permettent la prolifération des CMs par régulation négative des gènes ciblés. *In vivo*, les NPs de CS-DS ont atteint un niveau relatif d'expression de miR-199a-3p environ 6 fois plus élevé par rapport aux groupes témoins.

De futurs travaux seraient nécessaires pour évaluer l'efficacité de ces NPs de CS au niveau de cœurs infarcis chez le rat, pour étudier non seulement la prolifération des cardiomyocytes, mais également la récupération fonctionnelle du cœur. En cas de succès, un modèle de plus grand animal serait nécessaire. Il serait également utile d'étudier d'autres agents de ciblage car le TA s'est avéré légèrement cytotoxique *in vitro*.

Ce projet interdisciplinaire a fait ses preuves grâce aux collaborations mises en place avec deux membres du consortium Train-Heart. J'ai eu ainsi l'opportunité de pouvoir élargir mes connaissances ainsi que mon réseau. Et dans une plus large mesure, j'ai eu la possibilité d'interagir avec des scientifiques de différente expertise au sein du consortium européen.