

CHAPITRE 6 : Discussion et perspectives

Les résultats qui sont présentés dans les Chapitres 2 – 5 sont l'objet de discussions présentées dans leur section respective. Cette présente discussion vise donc à donner une perspective plus générale des résultats obtenus ainsi qu'à discuter des limites des résultats à l'étude dans cette thèse.

Retour sur les résultats

Accumulation et internalisation de l'anticorps monoclonal Ri7 au sein des cellules endothéliales du cerveau

Le RTf est le transporteur le plus étudié pour le ciblage thérapeutique au cerveau (Friden et al. 1991, Pardridge et al. 1994, Shi et al. 2000, Zhang et al. 2003b, Ulbrich et al. 2009). Pourtant, tel que décrit en introduction, le devenir au cerveau des anticorps monoclonaux ciblant ce récepteur demeure à ce jour un objet de controverse. Le clone Ri7 offre un avantage intéressant, bien que les épitopes exacts ciblés par le Ri7 ne soient pas connus, Ri7 semblerait se lier à une région du domaine extracellulaire du RTf différent du site de liaison de la Tf (Descamps et al. 1996, Lee et al. 2000). Cet AcM au départ a été développé pour étudier l'importance du RTf dans la prolifération cellulaire et plusieurs publications démontrent que ce clone ne cause pas de mort cellulaire et donc ne bloquerait pas l'entrée de la Tf *in vitro* (Lesley et al. 1985, Lesley et al. 1989). Ces études suggèrent ainsi une absence ou une très faible compétition avec la Tf (Lesley et al. 1985, Lesley et al. 1989). Dans le but de mieux comprendre le passage au cerveau de l'AcM Ri7 ciblant le RTf, nous avons effectué deux études visant à caractériser l'accumulation cérébrale du Ri7 *in vivo*. Dans la première étude, via l'utilisation l'AcM conjugué avec un fluorophore de type AF, nous avons observé que l'AcM anti-RTf s'accumulait bel et bien massivement au cerveau, lorsque quantifié dans un homogénat regroupant tout le cerveau. Cependant, nos analyses de microscopie en fluorescence ont démontré une accumulation au niveau des CECCs, car le signal était limité à la vascularisation cérébrale signifiant que le Ri7 ne franchit pas la BHE. Nos expériences nous ont par ailleurs permis de démontrer l'importance d'une approche de microscopie, car il s'agit probablement de la seule méthode réellement fiable pour discriminer le parenchyme cérébral des CECCs. Par la suite, une deuxième étude utilisant un complexe formé de la conjugaison du Ri7 avec des points quantiques nous a

permis de démontrer que l'utilisation de l'AcM permettait d'augmenter la biodisponibilité de l'AcM spécifiquement au cerveau et que cette accumulation était due à la liaison du Ri7 avec le RTf. De plus, l'utilisation des points quantiques nous a permis de combiner une approche de microscopie en fluorescence à des analyses de microscopie électronique. La microscopie en fluorescence nous a tout d'abord permis de confirmer à nouveau que l'accumulation cérébrale du Ri7 était restreinte aux CECCs. Par la suite, des analyses de microscopie électronique ont permis de démontrer que le complexe AcM-points quantique était internalisé au sein des CECCs. De plus, la visualisation des structures subcellulaires a permis de mettre en évidence que le Ri7 était incorporé dans les CECCs par endocytose et était retrouvé dans différents endosomes (précoces, tardifs, lysosomes) suite à son internalisation. Ces résultats suggèrent que l'AcM Ri7 ciblant le RTf serait un excellent vecteur pour cibler le CECCs. Comme diverses études suggèrent que plusieurs dysfonctions des CECCs contribueraient grandement à l'instauration et au maintien des maladies neurodégénératives, l'utilisation d'un vecteur ayant des caractéristiques similaires au Ri7 deviendrait un atout intéressant pour le développement de nouveaux traitements impliquant les cellules endothéliales.

Transport d'acides nucléiques dans les cellules endothéliales du cerveau via l'utilisation de nanoparticules

La thérapie génique représente une approche novatrice très intéressante pour le traitement des maladies neurodégénératives. Cependant, son développement est grandement limité par l'instabilité systémique des acides nucléiques suite à leur administration. De plus, pour cibler le cerveau, le problème à résoudre est d'autant plus ardu, car les acides nucléiques sont incapables d'internaliser et de franchir les CECCs. Afin que les maladies du SNC puissent bénéficier de stratégies innovatrices comme la thérapie génique, il est important de développer des approches permettant l'accumulation d'acides nucléiques au cerveau. Dans le but d'étudier le transport d'acides nucléiques au cerveau, nous avons utilisé deux types de nanoparticules différentes, soit une formulation micellaire polyionique et une formulation d'immunoliposomes. Dans la première étude avec les micelles, nous utilisons un fragment Fab' de l'anticorps Ri7 et pour la deuxième étude, le Ri7 complet, afin de cibler le RTf. Nous avons observé dans les deux études que les deux formulations de nanoparticules étaient incorporées par endocytose via leur liaison avec le RTf. De plus, nos analyses de quantification *in vitro* par analyse de colocalisation en microscopie confocale suggèrent que les micelles ciblant le RTf évitent en grande partie la dégradation lysosomale, et ce même après

une incubation de 24 h. Bien que qualitatives, les expériences de colocalisation avec les liposomes suggèrent aussi une accumulation partielle des liposomes ciblant le RTf au niveau des lysosomes. Par la suite, des injections systémiques chez la souris Tie2GFP ont démontré la capacité des micelles et des liposomes ciblant le RTf à transporter des acides nucléiques au niveau des CECCs. L'accumulation du signal fluorescent provenant du matériel génétique encapsulé dans les différentes nanoparticules suggère fortement que ces deux formulations sont internalisées et pourrait donc servir de vecteur pour le développement de thérapie génique afin de rétablir les dysfonctions endothéliales.

Discussion générale sur le projet et perspectives

La microscopie, une méthode de choix pour l'étude du ciblage thérapeutique au cerveau

Le premier résultat frappant obtenu durant cette thèse est la démonstration autant en microscopie en fluorescence qu'en microscopie électronique que l'AcM ciblant le RTf est en fait séquestré dans les CECCs (Paris-Robidas et al. 2011, Paris-Robidas et al. 2016). Les premières études effectuées avec des AcMs ciblant le RTf, dont plusieurs utilisant le clone Ri7, suggéraient que les AcMs traversaient les CECCs par transcytose et allaient s'accumuler dans le parenchyme cérébral (Bickel et al. 1994, Pardridge et al. 1994, Lee et al. 2000, Shi et al. 2001b). Cependant, en étudiant de plus près plusieurs de ces publications, on remarque que très peu d'articles s'attardent à démontrer la distribution cérébrale par une approche de microscopie. En effet, beaucoup de ces études concluent à une accumulation dans le parenchyme cérébral suite à des mesures directes (AcM radiomarqués) ou indirectes (activité enzymatique) sur un homogénat de cerveau, sans aucune discrimination entre les capillaires et le tissu cérébral (Lee et al. 2000, Shi et al. 2001a, Shi et al. 2001b, Zhang et al. 2003b). Cependant, dans ces conditions il est impossible de savoir si l'accumulation cérébrale est due à une internalisation dans les CECCs ou à une pénétration dans le parenchyme.

La déplétion capillaire a été développée pour séparer le parenchyme cérébral des vaisseaux sanguins (Triguero et al. 1990). Cette technique permet à l'aide d'un gradient de faire culotter les vaisseaux qui sont plus denses que les cellules neuronales. Cependant, cette technique possède certaines limitations, dont la principale étant la contamination de la fraction post-vasculaire par des capillaires et vice-versa. En effet, il existe des tests se basant sur l'activité d'enzyme spécifique aux CECCs (alcaline phosphatase, γ -GT) permettant d'évaluer la pureté de chaque fraction. Il a été

démontré à plusieurs reprises que la proportion des AcM ciblant le RTf était en fait équivalente à la proportion d'enzymes spécifiques aux CECCs retrouvées dans le surnageant (Moos et al. 2001, Paris-Robidas et al. 2016). Ces résultats suggèrent une contamination du surnageant par les capillaires et non une réelle pénétration dans le parenchyme cérébral (Moos et al. 2001, Paris-Robidas et al. 2016). De plus, des expériences d'immunofluorescence non publiées de notre laboratoire ont aussi démontré que la fraction contenant les capillaires cérébraux peut être contaminée par des cellules neuronales et astrocytaires soulignant ainsi l'importance d'utiliser une approche de microscopie afin de bien visualiser la distribution cérébrale des AcM utilisés. De plus, les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse montrent aussi l'intérêt de combiner dans une même étude plusieurs approches de microscopie. La microscopie en fluorescence est idéale pour effectuer des analyses de colocalisation, mais la limite de résolution de la majorité des microscopes ne permet pas de bien discriminer la superposition de deux éléments à proximité. Il est difficile avec la fluorescence de distinguer si une molécule est à l'intérieur d'une cellule ou tout juste à l'extérieur de la membrane plasmique. Cependant, la très haute résolution de la microscopie électronique permet de trancher sur la question et aussi de faire des observations au niveau subcellulaire. Cependant, les analyses de microscopie électronique sont basées sur des observations morphologiques (apparence, taille, position, densité) et peuvent être biaisées par l'orientation du tissu. De plus, la microscopie électronique permet difficilement d'avoir une vue globale sur l'étendue du marquage. Le développement de nouveaux microscopes à haute résolution en fluorescence pourrait cependant permettre de grandement améliorer la qualité de futures analyses de colocalisation.

Connaître les principaux tissus ou types cellulaires ciblés par l'anticorps Ri7 permettra de mieux développer d'éventuels nouveaux traitements et de par la suite faciliter leur transition vers la clinique. Cependant, la microscopie comporte un certain désavantage, car il s'agit d'une technique peu quantitative. Dans le but d'effectuer du ciblage thérapeutique, il est tout aussi essentiel de pouvoir quantifier l'accumulation cérébrale ou endothéliale. La perfusion cérébrale in situ (PCIS) a été développée tout d'abord chez le rat (Takasato et al. 1984) et adaptée chez la souris (Dagenais et al. 2000) par la suite pour justement permettre de mesurer le passage au cerveau des molécules. Par ailleurs, notre équipe a récemment adapté cette technique à l'utilisation de molécules fluorescentes (Alata et al. 2014). Cette méthodologie permet d'une part de connaître les concentrations exactes qui

atteignent le cerveau facilitant ainsi les calculs de pharmacocinétique associés et aussi d'éviter le métabolisme du foie pouvant générer des métabolites qui eux seraient capables de passer la BHE (Takasato et al. 1984).

De plus, il est important de mentionner que l'approche par microscopie nous a permis de confirmer nos résultats par détection immunologique à l'aide d'anticorps secondaires fluorescents ou couplés à des billes d'or. Suggérant ainsi que l'ajout d'un cargo aux AcMs ne semble pas affecter leur capacité à traverser la BHE (Paris-Robidas et al. 2011, Paris-Robidas et al. 2016). Afin de mieux développer de futurs protocoles basés sur le ciblage des systèmes de transport de la BHE, il serait important de combiner des approches quantitatives avec la microscopie. Malheureusement, une lacune dans la caractérisation de la distribution cérébrale des anticorps et/ou peptides ciblant le BHE est observée de manière généralisée dans les publications portant sur le ciblage thérapeutique au cerveau. En effet, au courant des dernières années, on remarque dans plusieurs publications marquantes dans le domaine du ciblage thérapeutique un manque au point de vue de la caractérisation des anticorps et molécules utilisés (Yu et al. 2011, Couch et al. 2013, Yu et al. 2014, Zuchero et al. 2016). Comme ces travaux sont bien souvent menés de front par des équipes de recherche de haut calibre, on peut se questionner à savoir pourquoi cette étape clé dans leur preuve de concept a été omise. De plus, comme plusieurs vecteurs font l'objet de brevets et sont la propriété exclusive de compagnies, il est difficile voir impossible pour des équipes indépendantes de reproduire les résultats.

Pourquoi le Ri7 est-il séquestré dans les cellules endothéliales ?

Les anticorps ciblant le RTf ont fait l'objet de nombreuses publications (Huwlyer et al. 1996, Lee et al. 2000, Moos et al. 2001, Gosk et al. 2004, Paris-Robidas et al. 2011, Yu et al. 2011, Alata et al. 2014, Bien-Ly et al. 2014, Paris-Robidas et al. 2016). Certaines de ces publications ont par ailleurs fait la démonstration de l'accumulation endothéliale de tels anticorps (voir tableau 12).

Tableau 12 : Résumé des diverses publications montrant une accumulation endothéliale des anticorps ciblant le récepteur de la transferrine

| Études | Anticorps | Cible | Design expérimental | Doses injectées |
|----------------------------|---|---------------|--|--|
| Friden et al., 1991 | OX26 | RTf de rat | Injection i.v. d'anticorps non marqués | 4.44 mg/kg |
| Bickel et al., 1994 | OX26 | RTf de rat | Conjugaison à des billes d'or de 5 nm Infusion via la carotide externe | Faible dose : 0.26 - 0.39 mg/kg Forte dose : 3300 mg/kg |
| Walus et al., 1996 | OX26 | RTf de rat | Injection i.v. d'anticorps non marqués | 1.78 mg/kg |
| Moos and Morgan, 2001 | OX26 | RTf de rat | Injection i.v. d'anticorps marqués ou non à 125I | 125I-OX26 P0 = 0.32 mg/kg P15 = 0.11 mg/kg P70 = 0.01 mg/kg Anticorps non marqués P15 = 5.36 mg/kg |
| Gosk et al., 2004 | OX26 | RTf de rat | Perfusion cérébrale in situ (PCIS) d'anticorps marqués ou non à 125I Injection i.v. de liposomes conjugués à OX26 | Anticorps non marqués PCIS : 0.39, 0.98 or 2.93 mg/kg 125I-OX26 PCIS: 0.09 - 1.40 mg/kg OX26-liposome PCIS : 2.48 mg/kg i.v. : 6.19 mg/kg |
| Paris-Robidas et al., 2011 | Ri7 | RTf de souris | Injection i.v. d'anticorps conjugués ou non avec un AF | 15 mg/kg |
| Yu et al., 2011 | anti-RTf/BACE1 anticorps bispécifiques | RTf de souris | Injection i.v d'anticorps marqués ou non à 131I | Non-marqués 20, 25 or 50 mg/kg 131I anti-RTf Dose mininale |
| Manich et al., 2013 | 8D3 | RTf de souris | Injection i.v. d'anticorps non marqués | 5 mg/kg |
| Alata et al., 2014 | Ri7 | RTf de souris | PCIS avec des anticorps conjugués à un AF | 5 mg/kg |
| Yu et al., 2014 | anti-RTf/BACE1 anticorps bispécifiques | RTf humain | Injection i.v. d'anticorps non marqués | Souris 5, 20 or 50 mg/kg Singes 30 mg/kg |
| Bien-Ly et al., 2014 | anti-RTf/BACE1 anticorps | RTf de souris | Injection i.v. d'anticorps non marqués ou marqués avec du pH-rodo | Non-marqués 5, 25 or 50 mg/kg |
| Niewohner et al., 2014 | Brain shuttle anti-RTf/BACE1 anticorps monovalents ou bivalents | RTf de souris | Injection i.v. d'anticorps non marqués | dFab : 16.7 mg/kg sFab : 13.3 mg/kg |
| Cabezon et al., 2015 | 8D3 | RTf de souris | Conjugaison à des billes d'or de 20 nm Injection i.v. | 21.5 mg/kg |
| Paris-Robidas et al., 2016 | Ri7 | RTf de souris | Injection i.v. d'anticorps conjugués à des points quantiques | 15 mg/kg |
| Villasenor et al., 2016 | Brain shuttle anti-RTf/BACE1 anticorps monovalents ou bivalents | RTf de souris | Injection i.v. d'anticorps non marqués | 6 mg/kg |

Abréviations : Intraveineuse, i.v.; perfusion cérébrale in situ, PCIS; Récepteur de la transferrine, RTf

Cependant, une question reste en suspens, pourquoi ces AcM restent-ils séquestrés dans les CECCs ? Pour répondre à cette question, il faut se pencher sur le mécanisme du transport de la Tf au cerveau. Il est important de mentionner que le transport du fer et de la Tf au cerveau fait toujours l'objet d'un débat. En effet, la démonstration que les CECCs étaient capables d'internaliser la Tf par endocytose (Fishman et al. 1987, Pardridge et al. 1987) a rapidement mené à la conclusion que la Tf

était acheminée vers le tissu neuronal par transcytose (Fishman et al. 1987, Pardridge 1988). Cependant, des études ont démontré que l'accumulation cérébrale du fer excédait grandement celle de la Tf réfutant ainsi en partie l'hypothèse de la transcytose de la Tf (Taylor et al. 1990). Une explication alternative propose que le complexe fer-Tf serait internalisé par les CECCs et une fois acheminé vers les endosomes, le fer se détacherait de la Tf suite à l'acidification des endosomes et serait transporté dans le cytosol des cellules (Moos, 2000 #494, Taylor et al. 1991, Morris et al. 1992, Moos et al. 2007). Par la suite, l'apo-Tf, ayant une forte affinité pour le RTf à pH acide, serait recyclée à la membrane plasmique où le pH physiologique entraînerait le détachement de l'apo-Tf (Moos et al. 2000, Moos et al. 2007). De manière similaire, les premiers résultats évoquant l'internalisation des AcMs ciblant le RTf ont mené à la conclusion hâtive que ces mêmes AcMs traversaient la BHE par transcytose (Friden et al. 1991, Pardridge et al. 1991, Bickel et al. 1994). Cependant, nos études suggèrent que le Ri7 aurait une forte affinité pour son récepteur et cette affinité ne semblerait pas affectée par le pH plus acide des endosomes (Paris-Robidas et al. 2011, Paris-Robidas et al. 2016).

Comme il semble exister un lien étroit entre l'affinité de la Tf pour son récepteur et sa capacité à effectuer de la transcytose, il est possible de penser que l'affinité des AcM ciblant le RTf agit de manière similaire. Cette hypothèse a d'ailleurs été étudiée par un groupe de recherche et fait l'objet de plusieurs publications (Yu et al. 2011, Bien-Ly et al. 2015, Zuchero et al. 2016). Dans ces publications, cette équipe a employé une stratégie assez simple, soit d'utiliser un AcM ayant une forte affinité pour le RTf (IC_{50} : 1.7 ± 0.1 nM) et de développer différentes variations de l'AcM avec des affinités plus faibles (IC_{50} : 6.9 ± 0.4 , 65 ± 12 and 111 ± 16 nM) (Yu et al. 2011). Dans leurs études, ils ont démontré qu'une diminution de l'affinité engendrait une augmentation de l'accumulation au niveau neuronal (Yu et al. 2011, Bien-Ly et al. 2015, Zuchero et al. 2016). De plus, une de leurs études suggère qu'une forte affinité de l'AcM pour le RTf entraînerait une dégradation massive du RTf via le lysosome et pourrait donc affecter l'efficacité d'un éventuel traitement (Bien-Ly et al. 2014). Plusieurs études se sont intéressées à l'affinité de l'AcM Ri7 pour le RTf (Lesley et al. 1984b, Bjorn et al. 1987, Alata et al. 2014). Une première étude en 1984 sur un modèle *in vitro* a permis d'estimer son K_d entre 0.17 – 2.5 nM. Par la suite, Bjorn et collaborateurs ont obtenu des résultats similaires en estimant le K_d de l'anticorps entre 1 - 2 nM (Bjorn et al. 1987). Dans notre laboratoire, des études de pharmacocinétique en PCIS ont permis de mesurer qu'une concentration

de 500 nM était nécessaire pour saturer *in vivo* le RTf (Alata et al. 2014). De plus, des résultats préliminaires non publiés de notre équipe ont estimé l'affinité du Ri7 conjugué avec une molécule fluorescente entre 10 – 20 nM. Bien que les valeurs diffèrent légèrement selon les méthodes expérimentales utilisées, toutes ces études suggèrent que le Ri7 possède une forte affinité pour le son récepteur.

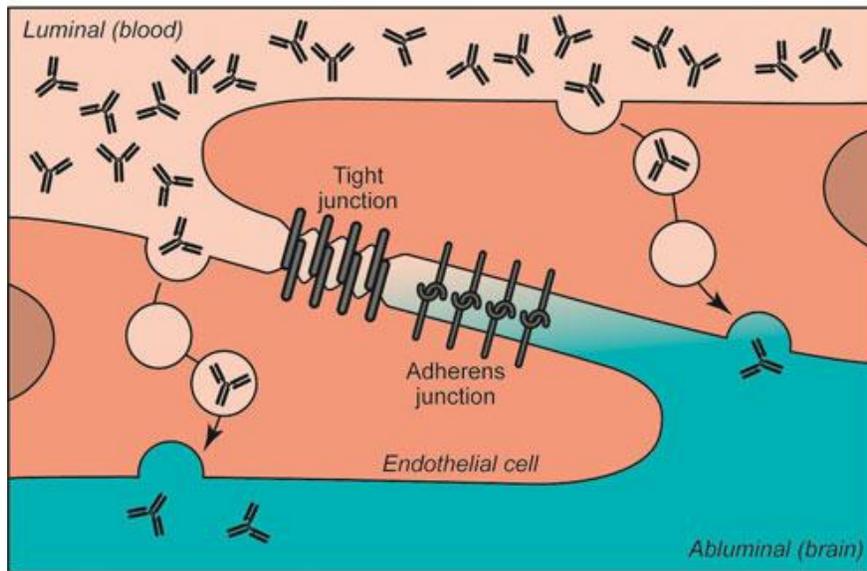
Comme ces études le suggèrent, il est fort probable que cet AcM soit en fait incapable de se détacher de son récepteur. En effet, nos résultats démontrent principalement une restriction du Ri7 dans les CECCs suite à l'injection systémique de l'AcM seul ou de l'AcM conjugué avec les NPs. En microscopie électronique, nous avons pu observer l'incorporation du Ri7 conjugué avec des points quantiques au niveau de différentes structures subcellulaires (vésicules, structures tubulaires, endosomes tardifs, lysosomes) des CECCs. Malgré la sensibilité de cette méthode, nous n'avons observé qu'une infime, voire artéfactuelle, accumulation des AcM dans le parenchyme cérébral. Cette faible accumulation peut, par ailleurs, être due à une interaction entre le Ri7 et le récepteur des IgG (FcRn) (Cooper et al. 2013, St-Amour et al. 2013). Cependant, nous avons aussi obtenu un résultat intrigant suite à l'injection systémique de NPs conjuguées avec un fragment Fab' de l'AcM Ri7. Le fragment Fab étant la partie de l'AcM responsable de la reconnaissance de l'antigène, les fragments conservent leur capacité de ciblage, mais en offrant quelques avantages dus entre autres à l'absence de la portion Fc (Mariani et al. 1991, Maynard et al. 2000, Beck et al. 2010). Lors de ces expériences chez la souris Tie2GFP, nous avons observé une faible pénétration de la NP dans le parenchyme cérébral. Cette possible accumulation dans le tissu cérébral pourrait être due à une diminution de l'avidité du fragment Fab'Ri7 pour le RTf en comparaison avec l'IgG complet. En effet, une récente étude a démontré que l'avidité de l'AcM pour sa cible pouvait aussi influencer la pénétration des anticorps ciblant le RTf dans le parenchyme (Niewoehner et al. 2014, Urich et al. 2015). Leurs travaux ont rapporté que des fragments Fab ayant une avidité moins forte pour le RTf du à leur mode de liaison monovalent pénétraient davantage dans le cerveau (Freskgård et al. 2014, Niewoehner et al. 2014, Urich et al. 2015).

La forte affinité, un avantage ou un désavantage ?

Au cours des dernières années, plusieurs publications ont mis de l'avant le lien entre l'affinité d'un AcM pour sa cible ainsi que son taux de pénétration au cerveau (Yu et al. 2011, Couch et al. 2013, Bien-Ly et al. 2014, Zuchero et al. 2016). Selon les auteurs de ces publications, l'utilisation des AcMs de forte affinité serait à proscrire, car en plus d'avoir une accumulation limitée aux CECCs, les AcMs de forte affinité entraîneraient une dégradation massive du RTf via le lysosome (Yu et al. 2011, Couch et al. 2013, Bien-Ly et al. 2014, Zuchero et al. 2016). Cependant, nous avons quantifié les niveaux de RTf sur les CECCs suite à l'injection répétée chez la souris de deux différentes formulations de nanoparticules et dans aucun cas nous n'avons observé une baisse des niveaux du récepteur. De plus, nos analyses d'immunofluorescence sur les cellules N2A démontrent une colocalisation partielle avec le lysosome. Contrairement aux données publiées par Bien-Ly et collaborateurs (Bien-Ly et al. 2014), bien que nos résultats suggèrent une certaine accumulation lysosomale, cette accumulation ne semble pas assez importante pour déclencher de dégradation massive du RTf.

L'utilisation des AcM de faible affinité présente aussi un problème majeur, car la dose nécessaire à injecter pour obtenir une accumulation cérébrale significative doit être très élevée (Yu et al. 2011). En effet, la diminution de l'affinité de l'AcM faciliterait grandement son détachement non seulement près de la membrane abluminale, mais à tout moment suite à sa liaison au récepteur (Rudnick et al. 2009). Tel qu'illustré dans la publication de Yu et collaborateurs (Figure 41) l'injection d'une faible quantité d'un AcM possédant une faible affinité entraîne une accumulation cérébrale très limitée (Yu et al. 2013). Il est donc facile d'assumer que l'utilisation en clinique avec des doses dites thérapeutiques de ce type d'anticorps entraînera des coûts de traitement imposants (Lajoie et al. 2015).

A Passive Transport



B Receptor-mediated Transport

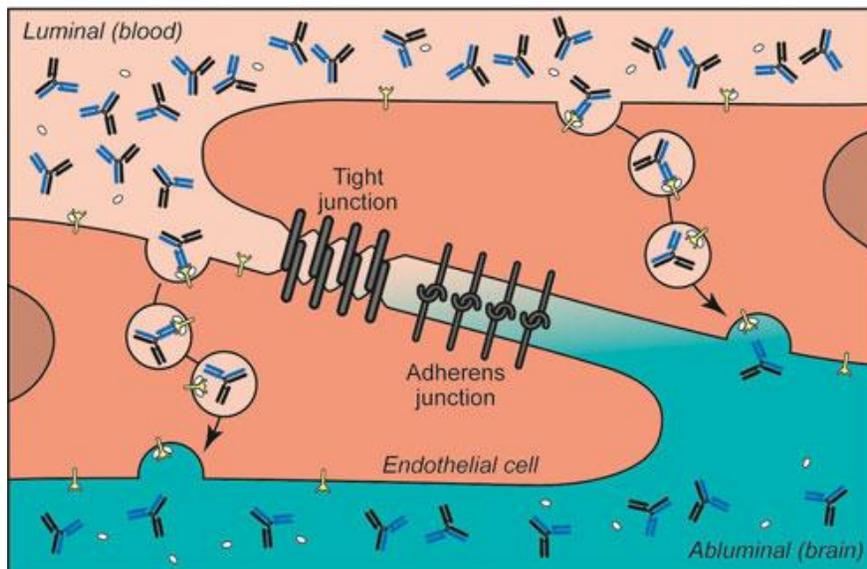


Figure 47: Comparaison de l'accumulation cérébrale des anticorps de forte affinité versus les anticorps de faible affinité. Tiré de Yu & Watts 2013

De plus, l'injection d'une grande quantité d'AcM possédant une faible affinité par voie systémique signifierait certes une éventuelle accumulation cérébrale, mais aussi une imposante quantité d'anticorps en circulation capable d'agir en périphérie (Gatter et al. 1983). Bien qu'une récente étude de biodistribution chez le singe n'ait pas rapporté d'effet secondaire (Yu et al. 2014), une autre publication avait démontré que l'utilisation de quantités thérapeutiques d'AcMs (25 et 50 mg/kg)

engendrait une réduction importante des réticulocytes chez la souris (Couch et al. 2013). Il est donc possible de penser que l'injection répétée de grande quantité d'anticorps puisse entraîner des effets secondaires importants chez l'humain.

Lorsqu'il est question du traitement des maladies neurodégénératives, il est facile de penser qu'une accumulation endothéliale soit un inconvénient majeur. Cependant, avec l'avancement des recherches sur l'implication de l'UNV dans les maladies neurodégénératives, une accumulation importante dans les CECCs deviendrait plutôt un atout pour le développement de nouveaux traitements. Les CECCs deviendraient ainsi une porte d'entrée vers le cerveau.

Ciblage thérapeutique des cellules endothéliales du cerveau

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies très complexes influencées par de nombreux facteurs. En plus de l'insulte neuronale, les CECCs seraient aussi affectées au cours du développement de la maladie (Montine et al. 2014, Drouin-Ouellet et al. 2015, Korczyn 2015, Montagne et al. 2015, Snyder et al. 2015, Sweeney et al. 2015, Zhao et al. 2015). Il a été démontré que plusieurs dysfonctions vasculaires sont associées aux pathologies du CNS comme l'hypertension, l'altération du débit sanguin cérébral ainsi qu'une perte d'intégrité de la BHE (Alvarez et al. 2011a, Iadecola 2013, Montagne et al. 2015, Snyder et al. 2015, Iturria-Medina et al. 2016). Plus précisément, des altérations moléculaires chez les CECCs seraient impliquées dans l'instauration et le maintien de la neurodégénération. Il serait donc possible de traiter les maladies neurodégénératives en ciblant directement les CECCs par des approches de thérapie génique.

La maladie d'Alzheimer

Plusieurs études ont été publiées sur les nombreuses pathologies endothéliales dans la MA et ont permis d'identifier plusieurs cibles thérapeutiques potentielles.

RAGE/LRP-1

Le système de transport du peptide A β RAGE/LRP-1 serait une cible thérapeutique pour le traitement de la MA. Il a été démontré que le peptide A β peut traverser la BHE et pénétrer dans

circulation sanguine via le récepteur LRP-1 pour être éliminé en périphérie par les LRP (Deane et al. 2004a, Sagare et al. 2007). De plus, il a été observé une diminution des niveaux de LRP-1 chez certains patients souffrant de la MA avec une forte accumulation vasculaire d'Aβ (Shibata et al. 2000, Deane et al. 2004a, Donahue et al. 2006). La surexpression de LRP-1 au niveau des CECCs pourrait donc favoriser l'élimination d'Aβ du cerveau ainsi que sa clairance en périphérie. De plus, une altération des niveaux d'ABCB1 (P-gp), impliqué dans l'efflux d'Aβ, est aussi associée avec une accumulation cérébrovasculaire du peptide et sa surexpression, de concert avec LRP-1, pourrait contribuer à la diminution de la pathologie amyloïde chez les patients souffrant de la MA (Cirrito et al. 2005, Deo et al. 2014, Hartz et al. 2016).

À l'opposé de LRP-1, RAGE est un récepteur impliqué dans l'influx d'Aβ vers le cerveau (Du Yan et al. 1996, Arancio et al. 2004, Deane et al. 2004b, Deane et al. 2012). Plusieurs publications ont par ailleurs observé une augmentation des niveaux de RAGE chez les patients souffrant de la MA ainsi que dans certains modèles animaux (Du Yan et al. 1996, Deane et al. 2004b, Donahue et al. 2006). De plus, comme il a été démontré que l'Aβ périphérique est un important précurseur de l'Aβ cérébrale (Zlokovic et al. 1993, Martel et al. 1996, Mackic et al. 1998, Mackic et al. 2002), l'utilisation de l'interférence à l'ARN pour normaliser les niveaux endothéliaux de RAGE chez les patients souffrant de la MA pourrait aussi être une avenue thérapeutique intéressante capable de ralentir la progression de la maladie. Par ailleurs, une étude clinique de 12 mois a été réalisée avec un antagoniste de RAGE, le PF-04494700 (TTP488). Les premiers résultats de cette étude ont été assez mitigés, car une aggravation des scores cognitifs avait été observée chez les patients ayant reçu la forte dose et qu'aucune amélioration des performances cognitives n'avait été rapportée chez les patients ayant reçu la faible dose en comparaison avec le placebo (Galasko et al. 2014). Toutefois, un suivi de 6 mois après l'arrêt du traitement a permis de démontrer un rétablissement du score cognitif des patients traités avec la forte dose et une amélioration de la cognition chez les patients traités avec la faible dose (Burstein et al. 2014). Cette étude suggère donc que bloquer l'activation de RAGE peut exercer un effet résiduel sur la progression de la maladie. La modulation des niveaux des récepteurs impliqués dans l'influx/l'efflux d'Aβ pourrait donc aussi agir directement sur le développement de la maladie et ainsi ralentir ou stopper la progression de la MA.

GLUT1

Plusieurs études ont mis en évidence un important déficit énergétique dans la MA (Piert et al. 1996, Ding et al. 2013, Winkler et al. 2015). Ce déficit précéderait l'apparition des premiers symptômes de la maladie (Jagust et al. 1991, Piert et al. 1996, Minoshima et al. 1997, Hunt et al. 2007). De plus, comme il existerait un lien entre le déficit en glucose et la sévérité des symptômes de la MA (Mosconi 2005, Cerami et al. 2015), il est possible de penser que ce manque énergétique est du moins en partie responsable de la neurodégénérescence observée dans la MA (Zlokovic 2005, Zlokovic 2011). Une approche par thérapie génique visant la surexpression de GLUT1 dans les CECCs pourrait être bénéfique dans la MA en limitant la mort neuronale.

Les facteurs neurotrophiques

Les FNts possèdent un grand potentiel thérapeutique pour le traitement des maladies neurodégénératives (Zlokovic 2011, Allen et al. 2013, Lu et al. 2013, Numakawa 2014). La MA est caractérisée par les marqueurs neuropathologiques A β et tau, mais aussi par une perte accrue des neurones cholinergiques (Rossor et al. 1981). Deux molécules impliquées dans la survie des neurones cholinergiques, les FNts NGF (*nerve growth factor*) et BDNF (Knusel et al. 1996, Ha et al. 1999, Auld et al. 2001, Tirassa et al. 2003) ont été identifiées comme étant des cibles thérapeutiques intéressantes (Allen et al. 2013, Lu et al. 2013). De plus, une diminution du BDNF est aussi observée dans plusieurs pathologies neurodégénératives, dont la MA (Phillips et al. 1991, Connor et al. 1997, Holsinger et al. 2000, Zuccato et al. 2009) et cette baisse importante de facteurs de croissance pourrait mener à une augmentation de la mort neuronale (Allen et al. 2013). L'administration de FNts pourrait donc avoir un effet bénéfique sur la progression de la MA en ralentissant considérablement les pertes neuronales et synaptiques.

Malgré le fait que certaines études cliniques aient rapporté des effets mitigés suite à des injections intracérébrale ou intraventriculaire de NGF (Seiger et al. 1993, Jönhagen et al. 1998, Nauta et al. 1999, Nilsson et al. 2010), plusieurs études précliniques ont mis en évidence le potentiel thérapeutique des FNts (Nagahara et al. 2009, Nagahara et al. 2011, Shin et al. 2015, Zhang et al. 2015, Wu et al. 2016). Comme les FNts ne peuvent franchir la BHE, les protocoles d'études cliniques doivent avoir recours à des modes d'injections invasifs qui résultent en une mauvaise diffusion du

composé dans le parenchyme cérébral (Pardridge 2007a, Pardridge 2007c). Cependant, le ciblage des CECCs pourrait permettre le développement d'un mode d'administration systémique des FNts. En effet, les CECCs, étant un membre clé impliqué dans le maintien de l'intégrité de l'UNV, sécrètent une grande quantité de facteurs solubles afin de communiquer avec les neurones et les astrocytes (Abbott et al. 2006, Abbott et al. 2010). De plus, étant donné la grande surface de contact procurée par la vascularisation cérébrale, on estime que pratiquement chaque neurone est perfusé par son propre capillaire. D'un point de vue thérapeutique, il serait donc envisageable de transfecter les CECCs pour surexprimer le NGF ou le BDNF et de tirer profit du potentiel de sécrétion de celles-ci dans tout le cerveau. Les FNts étant des facteurs solubles, ils pourraient facilement être sécrétés et agir sur la survie neuronale. Des études ont par ailleurs mis en évidence la faisabilité d'une telle approche (Jiang et al. 2002, Jiang et al. 2003, Chen et al. 2009, Thomsen et al. 2011). Suite à l'injection systémique de nanoparticules contenant de l'ADN codant pour le gène de GDNF dans un modèle de la MP, le rat 6-OHDA, Jiang et collaborateurs ont observé une hausse des niveaux de GDNF, une amélioration significative sur la performance des animaux au test de l'apomorphine ainsi qu'une augmentation des niveaux de dopamine (Jiang et al. 2003).

BACE1

BACE1, une enzyme impliquée dans le clivage de la PPA en A β , contribuerait au développement de la MA selon la théorie de la cascade amyloïde (Probst et al. 2012). De plus, de légères hausses ont été observées chez des patients souffrant de la forme sporadique de la MA (Yang et al. 2003). BACE1 est principalement exprimée dans les neurones (Zhao et al. 2007, Kandalepas et al. 2013), mais la présence de l'enzyme a récemment été démontrée dans les CECCs et pourrait grandement contribuer à la pathologie amyloïde vasculaire (Devraj et al. 2016). BACE1 est l'une des cibles thérapeutiques les plus en vue comme traitement de la MA (May et al. 2011, Kandalepas et al. 2013). Cependant, comme la présence de la BHE limite grandement le développement d'inhibiteur de BACE1 (Klaver et al. 2010), une alternative intéressante serait le ciblage de BACE1 endothélial à l'aide du Ri7 ou tout autre AcM s'accumulant dans les CECCs. L'expression de BACE1 pourrait être inhibée par des anticorps bispécifiques ciblant BACE1/RTf ou par une approche de thérapie génique où des pARNi contre BACE1 seraient encapsulés dans des nanoparticules. De plus, comme BACE1 est une enzyme impliquée dans plusieurs processus neuronaux importants (Barão et al. 2016), il a été démontré qu'une inhibition complète de la protéine entraîne des problèmes de myélinisations (Hu

et al. 2006, Willem et al. 2006, Hu et al. 2008) et de plasticité synaptique (Laird et al. 2005, Kobayashi et al. 2008, Wang et al. 2008a, Filser et al. 2015). L'inhibition de BACE1 endothéliale, résultant en une inhibition partielle de l'enzyme, pourrait avoir un effet bénéfique en limitant grandement les effets néfastes associés à une diminution trop drastique de son activité enzymatique (Kimura et al. 2010).

Bien que cette section de la discussion ait été consacrée aux potentielles cibles thérapeutiques pour la MA, les pathologies endothéliales étant rapportées dans de nombreuses maladies neurodégénératives, cette approche pourrait être transposée à un grand nombre de pathologies du SNC en adaptant tout simplement la cible thérapeutique. Par exemple, des études ont rapporté qu'une invalidation du gène codant pour le récepteur de l'IL-1 pouvait engendrer une résistance au développement de la pathologie EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) chez la souris (Schiffenbauer et al. 2000, Paré et al. 2017) (Schiffenbauer et al. 2000; Paré et al. 2016) ou un ralentissement du développement et de la sévérité de la pathologie (Li et al. 2011, Paré et al. 2017). Il pourrait alors être intéressant d'encapsuler de pARNi ciblant le récepteur de l'IL-1 et d'évaluer l'effet thérapeutique dans un modèle expérimental de la SP.

Comment transfecter les cellules endothéliales du cerveau

Plusieurs cibles thérapeutiques intéressantes au sein des CECCS ont été identifiées (Deane et al. 2004b, Donahue et al. 2006, Winkler et al. 2015, Devraj et al. 2016) et bénéficieraient grandement du développement d'une approche de thérapie génique. Les virus sont présentement les vecteurs préférentiellement utilisés pour la thérapie génique à cause de leur haut taux de transfection. Cependant, les stratégies de transfection des cellules neuronales sont souvent basées sur des injections intracérébrales, car peu de virus sont capables de franchir la BHE (Assmann et al. 2016). En effet, seuls quelques sérotypes de l'AAV (AAV9, AAVrh.8 AAVrh.10) auraient la capacité de transfecter les cellules du parenchyme cérébral suite à une injection systémique (Duque et al. 2009, Bevan et al. 2011, Gray et al. 2011, Dayton et al. 2012, Yang et al. 2014). De plus, les vecteurs classiques utilisés pour la thérapie génique comme les adénovirus, les lentivirus ou les AAVs ne possèdent pas ou peu de tropismes pour les CECCs malgré leur capacité à transfecter plusieurs variétés de cellules endothéliales (Pöhlmann et al. 2001, Chen et al. 2005). Cependant, ces virus peuvent être modifiés afin d'exprimer différentes molécules de surface (De Palma et al. 2003, Müller

et al. 2003, Pariente et al. 2008, Varadi et al. 2012) et suite à l'identification de peptides capable de cibler les CECCs, des équipes de recherche ont développé des vecteurs viraux capables de transférer les CECCs (Pasqualini et al. 1996, Work et al. 2006). Bien que ce ciblage soit non-spécifique au cerveau, Chen et collaborateurs ont démontré, dans le contexte d'une pathologie lysosomale, que la transfection des CECCs pouvait engendrer des effets thérapeutiques à grande échelle dans le cerveau en entier grâce au potentiel de sécrétion des CECCs (Chen, 2009 #136, Chen et al. 2009). Dans cette étude, suite à la transfection des CECCs avec des AAVs surexprimant la β -glucuronidase, les auteurs ont pu observer une diminution des inclusions dans le cortex, l'hippocampe et le striatum chez un modèle murin de la MPS VII (Chen et al. 2009). Récemment, Körbelin et collaborateurs ont identifié plusieurs peptides ciblant les CECCs et ont démontré que les AAVs exprimant le peptide NRGTEWD (AAV-BR1) à leur surface avaient une spécificité accrue pour les CECCs, car l'expression du vecteur était difficilement détectable dans les autres organes (Körbelin et al. 2016). Dans cette étude, ils ont aussi démontré le potentiel thérapeutique du vecteur AAV-BR1 pour le traitement de pathologies endothéliales (Körbelin et al. 2016).

Les NPs sont aussi un outil très intéressant pour le ciblage thérapeutique des CECCs. Tout d'abord, les NPs permettent de protéger des molécules thérapeutiques qui y sont encapsulées et maximisent donc leur livraison au site d'action. De plus, leur surface est facilement modifiable et ainsi il est plus simple d'atteindre le cerveau en limitant la transfection non spécifique. En effet, une très grande quantité de récepteurs et de transporteurs sont enrichis sur les CECCs favorisant ainsi l'accumulation de NPs ciblées (Gosk et al. 2004, Kowalski et al. 2014, Paris-Robidas et al. 2016). De plus, l'ajout d'un promoteur spécifique à la construction d'ADN plasmique permet d'augmenter la spécificité de l'expression du transgène (Velasco et al. 2001). Bien que plus sécuritaire pour l'organisme, l'utilisation des NPs pour le traitement des CECCs par thérapie génique présente un certain désavantage. De manière générale, les cellules en mitose seront plus sensibles aux différents agents de transfection (Tseng et al. 1999). Les NPs sont généralement reconnues comme étant très dépendantes du stade de division cellulaire afin de pouvoir acheminer leur matériel génétique au noyau (Escρίου et al. 2001, Lechardeur et al. 2002, Kanatani et al. 2006). À l'âge adulte, les CECCs sont principalement dans un état non mitotique (Robertson et al. 1985) et limitent donc le transfert du matériel génétique dans le noyau (Burkhart et al. 2015). Une étude effectuée à l'aide d'un modèle de culture primaire de CECCs a rapporté un taux de transfection de 4% (Burkhart et al. 2015).

Certaines stratégies peuvent être employées pour augmenter les taux d'expression d'un gène transfecté. Tout d'abord, il a été démontré que l'utilisation d'un élément de translocation nucléaire permettait l'augmentation des taux de transfection de 10-15 fois *in vitro* (Brandén et al. 1999, Ludtke et al. 1999, Zhang et al. 2009a). La transfection d'ARNm au niveau cytoplasmique pourrait aussi être une alternative intéressante pour augmenter les taux d'expression dans les CECCS. De plus, certaines études ont aussi suggéré qu'il était possible de diriger les NPs vers certaines organelles spécifiques (Biswas et al. 2014, Jhaveri et al. 2016). Par exemple, l'ajout de molécules telle la rhodamine 123 (Biswas et al. 2011, Santos et al. 2014) ou de *mitochondrial-targeting signal* (Lin et al. 2014) permettrait une accumulation accrue des NPs au sein des mitochondries tandis que la rhodamine B favoriserait l'accumulation lysosomale (Thekkedath et al. 2013). Il serait donc possible d'ajouter un deuxième ligand et d'améliorer ainsi le relâchement spécifique de la NP. En combinant la rhodamine B et un AcM ciblant le RTf, cette stratégie pourrait être particulièrement avantageuse pour soigner les pathologies lysosomales.

L'interférence à l'ARN pourrait aussi être une approche intéressante de thérapie génique sur les CECCs. De plus, l'utilisation de pARNi ne requiert pas de transport nucléaire. Les pARNi agissent directement sur les ARNm présents dans le cytoplasme des cellules. Une fois relâchés des endosomes, les pARNi n'auraient pas à franchir la membrane nucléaire et seraient donc en théorie plus faciles à utiliser dans les CECCs que l'ADN plasmique. Cependant, il réside une certaine difficulté avec l'utilisation des pARNi en comparaison avec l'ADN plasmique. La transfection de cellules avec de l'ADN plasmique engendrera l'expression d'un gène exogène et l'utilisation d'un gène rapporteur permettra une visualisation directe ainsi qu'une quantification de l'efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo*. Par contre, avec l'utilisation de pARNi, l'efficacité de transfection est plus difficilement mesurée avec un pARNi rapporteur fluorescent et est évaluée via l'effet du pARNi sur les niveaux d'ARNm et de la protéine ciblée. Une inhibition modeste sera donc difficile à visualiser, surtout sur les niveaux des protéines, car ils sont aussi dépendants de la dégradation naturelle de la protéine d'intérêt. L'utilisation de pARNi fluorescents permettra de bien visualiser le matériel génétique dans les NPs et dans les endosomes, mais une fois relâché dans le cytosol des cellules, les pARNi fluorescents seront difficiles à visualiser. Il existe des indicateurs de transfection, dont le siGLO Red qui est utilisé dans plusieurs travaux présentés dans cette thèse. Une fois libéré

dans le cytosol, cet analogue d'ARN double brin fluorescent devrait être transporté au niveau du noyau et un signal fluorescent nucléaire diffus devrait être visible en microscopie. Cependant, très peu de publications rapportent de tels résultats (Wang et al. 2008b). La grande majorité des publications rapportent plutôt un signal fluorescent ponctué dans le cytosol des cellules, colocalisant parfois avec les noyaux (Xian et al. 2005, Vasudevan et al. 2008, Johnson et al. 2009, Nabzdyk et al. 2011, Wong et al. 2011, Nabzdyk et al. 2012, Roshan et al. 2014). Il est donc difficile de conclure sur l'efficacité de la transfection même avec cet outil spécialisé. De plus, la technologie CRISP/cas9 pourrait aussi être appliquée aux pathologies endothéliales retrouvées dans les maladies du SNC (Guan et al. 2016). Par exemple, des maladies génétiques comme la adrénoleukodystrophie associée au chromosome X qui est causée par une mutation du gène codant pour ABCD1 pourraient bénéficier d'une stratégie ciblant les CECCs (Musolino et al. 2015).

Ciblage des CECCS versus les autres cellules endothéliales

Bien que nos études aient démontré une augmentation significative de l'accumulation cérébrale suite à la conjugaison d'AcM ciblant le RTf, il est tout de même important de mentionner que le RTf est un récepteur exprimé dans tout l'organisme, mais son expression est particulièrement enrichie à la BHE (jusqu'à 15 fois (Zuchero et al. 2016)). L'utilisation d'AcM ciblant le RTf pourrait donc engendrer la transfection des cellules endothéliales du corps en entier. Pour certaines maladies, telles les pathologies lysosomales, l'expression ubiquitaire du RTf pourrait présenter un grand avantage en permettant le remplacement enzymatique dans tous les tissus. Cependant, pour les maladies neurodégénératives où une stratégie de neuroprotection/neurorestauration via l'expression de FNts serait envisagée, l'utilisation d'AcM ciblant le RTf pourrait être une lame à double tranchant et engendrer des effets secondaires importants. Cependant, comme mentionné préalablement, il est possible de limiter l'expression aux CECCs en utilisant des promoteurs spécifiques.

Une autre stratégie pour augmenter la spécificité aux CECCs serait de cibler des transporteurs plus spécifiques à la BHE, voire exclusifs. Des études de protéomique ont démontré que certains transporteurs étaient enrichis entre 5 et 135 fois en comparaison avec les autres cellules endothéliales (Zuchero et al. 2016). De plus, des études en cours dans notre laboratoire visent à développer de nouveaux anticorps ciblant différents transporteurs présents à la BHE, telle SNAT5, SCRB1, LEPR, etc. Il sera donc très intéressant dans le futur de ce projet d'étudier la biodistribution

de ces nouveaux anticorps afin de voir si leur utilisation permet une meilleure sélectivité du cerveau. Une étude récente suggère que cibler CD98hc, basogen et GLUT1 qui sont enrichis de 15, 2.5 et 135 fois aux CECCs en comparaison avec les autres cellules endothéliales permettrait une accumulation significative au cerveau (Zuchero et al. 2016). Cependant, cette étude ne comporte pas d'analyse de biodistribution (Zuchero et al. 2016).

Est-ce que les dysfonctions de la BHE observées dans les maladies neurodégénératives peuvent affecter le ciblage thérapeutique ?

De nombreuses dysfonctions cérébrovasculaires ont été observées chez les patients souffrant de maladies neurodégénératives ainsi que dans plusieurs modèles animaux reproduisant ces maladies (Bennett et al. 2010, Alvarez et al. 2011a, Bell et al. 2012, Blair et al. 2015, Montagne et al. 2015, Montagne et al. 2016, Nelson et al. 2016, Tai et al. 2016, Zenaro et al. 2017). Cependant, très peu d'études se sont intéressées à savoir comment ces pathologies pouvaient affecter la biodisponibilité des composés biopharmaceutiques au cerveau. Par contre, une récente étude a mis en évidence l'absence d'altération de l'accumulation cérébrale d'AcM ciblant le RTf dans plusieurs modèles murins de la MA (Bien-Ly et al. 2015). De plus, aucune variation des niveaux du RTf dans le cerveau n'a été observée dans les modèles murins étudiés ainsi que chez une cohorte de patients souffrant de la MA (Bien-Ly et al. 2015). Ces données sont par ailleurs en accord avec des résultats non publiés de notre laboratoire démontrant qu'il n'y a aucune différence de l'accumulation du Ri7 chez la souris 3x-TgAD, en comparaison avec les souris de type sauvage. Il en est de même pour l'analyse des niveaux du RTf qui sont inchangés chez les souris transgéniques en comparaison avec les souris sauvages du même âge. De manière surprenante, cette étude ne rapporte pas de changements majeurs pour la perméabilité de la BHE dans les modèles utilisés (Bien-Ly et al. 2015). Ces résultats sont corroborés par d'autres publications suggérant ainsi que les perturbations de l'intégrité de la BHE sont moins prononcées que ce qui était pensé par le passé (Bourasset et al. 2009, Do et al. 2014, St-Amour et al. 2014, Alata et al. 2015, Bien-Ly et al. 2015). Des études provenant de notre laboratoire sur le modèle de souris 3xTg-AD démontrent davantage la présence d'une altération du volume vasculaire cérébral causé par un épaissement de la lame basale (Bourasset et al. 2009, Do et al. 2014) plutôt qu'une perturbation de l'intégrité de la BHE. Bien que les données sur le transport des composés biopharmaceutiques soient difficiles à obtenir chez

l'humain, les résultats obtenus chez la souris suggèrent que les pathologies endothéliales associées aux maladies neurodégénératives n'affecteraient pas certains systèmes de transport comme le RTf (Bien-Ly et al. 2015).

Perspectives

Au terme des travaux effectués dans cette thèse, plusieurs questions restent toujours en suspens. En effet, les résultats de caractérisation cellulaire obtenus sur les modèles N2A et bEnd5 ouvrent la porte à de nouvelles expériences qui pourraient être effectuées afin de mieux comprendre et ainsi de raffiner l'approche pour la thérapie génique. Tout d'abord, la question du relâchement du matériel génétique de la nanoparticule a été effleurée par l'utilisation du marqueur de transfection siGLO, mais gagnerait à être approfondie. En effet, il serait très intéressant de procéder à des incubations avec les nanoparticules en faisant varier différents paramètres (temps d'incubation, pH, température, etc.) afin de connaître les propriétés de la nanoparticule et ainsi de pouvoir, du moins en partie, prédire son comportement. De plus, l'utilisation de lipides et d'un cargo fluorescents pourrait permettre de suivre en temps réel le relâchement du contenu de la nanoparticule sur un modèle cellulaire. Le relâchement du matériel de plusieurs types de nanoparticules dont les micelles polyioniques utilisées durant cette thèse est grandement influencé par le pH de son environnement. Une étape importante afin d'obtenir un relâchement ciblé est donc de connaître en détail le mécanisme d'internalisation ainsi que le devenir subcellulaire de la nanoparticule. Pour se faire, il serait intéressant de tester des inhibiteurs de la clathrine et de la calvéoline afin de confirmer le mécanisme d'internalisation des nanoparticules. De plus, des analyses de colocalisation plus poussées avec de nouveaux marqueurs cellulaires pourraient aussi être effectuées. En effet, le trafic endosomal est relié à l'expression des de la famille de protéines GTPases Rab. On retrouve Rab4 sur les vésicules de recyclage qui retournent à la membrane, Rab5 sur les endosomes de triages, Rab8 et Rab11 sur les endosomes de recyclage et Rab7 et Rab9 sur les endosomes tardifs (Grant et al. 2009, Rajendran et al. 2010). L'utilisation de marqueurs spécifiques pour différents membres de la famille de protéines Rab nous en apprendrait davantage sur le mécanisme d'internalisation et de recyclage des nanoparticules. Par la suite, en fonction des résultats obtenus, il serait donc possible d'effectuer certaines modifications dans la composition des nanoparticules afin de favoriser le relâchement ciblé de leur contenu et ainsi de favoriser la transfection des cellules ciblées.