

TITRE DU PROJET : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE MICROPARTICULES CHARGÉES EN pARNi POUR LE TRAITEMENT DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR (50%):

Nom : MARTIN

Prénom : Hélène

Co-directeur de thèse (50%) :

Nom : MOULARI

Prénom : Brice

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- nom et label de l'unité de recherche :

UMR 1098 RIGHT

UFC, EFS, INSERM

Equipe TAI-IT

- localisation

UFR Sciences de la Santé

19 rue Ambroise Paré

25000 Besançon

- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu

Directeur : Hélène MARTIN (50%)

Co-directeur : Brice MOULARI (50%)

- adresse courriel du contact scientifique

helene.martin@univ-fcomte.fr

- titre du projet : Synthèse et évaluation de microparticules chargées en pARNi pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

- description du projet (2 pages maximum) :

I- Contexte

Le nombre de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), dont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), est estimé à 1,3 million en Europe [1]. Les traitements actuels ne sont pas curatifs et font appel à des médicaments anti-inflammatoires qui aident à induire et/ou à maintenir la rémission. Ils comprennent des dérivés de l'aminosalicylate, des corticostéroïdes, des immunomodulateurs et des produits biologiques. Leur utilisation se heurte cependant à des problèmes d'efficacité, de résistance ou de toxicité. Les médicaments biologiques (anti-TNF, anti-intégrines, anti-interleukines) sont prescrits chez 70 % et 25 % des patients atteints de la MC et de la RCH, en cas d'échec des traitements non biologiques. Cependant, des cas d'échecs primaire et secondaire peuvent être observés en raison d'une clairance accrue des anticorps ou d'un ciblage déficient [2]. Jusqu'à 40 % des patients ne répondent pas aux anti-TNF [3]. En outre, des cas d'infections et de cancers de la peau ont été signalés après l'administration d'anti-TNF [4].

II- Objectifs

L'objectif général du projet est de développer une stratégie alternative aux produits biologiques pour le traitement des MICI modérées à sévères, par l'administration locale de petits ARN interférents (pARNi). Après administration orale, le pARNi inhibera localement l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Le projet sera basé sur la technologie développée par l'équipe coordinatrice (brevet déposé : n°23306223.1). Le produit consiste en des microparticules gastrorésistantes (MPs) contenant une suspension de nanoparticules lipidiques (LNPs) chargées en pARNi et spécifiquement conçues pour la transfection. Les MPs protègent le pARNi de la dégradation jusqu'au site d'action et interagissent spécifiquement avec les zones intestinales inflammées par ciblage passif [5]. Une preuve de concept utilisant le pARNi TNF α a démontré les propriétés gastrorésistantes des MPs et un effet thérapeutique dans un modèle murin de colite induite par le 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Cette technologie offre de nombreux avantages par rapport aux stratégies biologiques :

- Réduction des effets indésirables grâce à une action locale
- Immunogénicité réduite par rapport aux anticorps
- Action simultanée sur plusieurs protéines cibles avec différents pARNi, à l'instar des stratégies biologiques doubles utilisées chez les patients atteints de MICI réfractaires [6], [7]
- Administration orale aisée par rapport aux voies parentérales.

Pour optimiser et valider la stratégie d'administration orale de pARNi à l'aide de MPs, les objectifs spécifiques suivants doivent être atteints :

- 1- Conception de LNPs chargées en pARNi pour transférer efficacement les cellules immunitaires des muqueuses. Des pARNi ciblant le TNF α , IL12/IL23 p40, IL12 p35, IL23 p19 et α 4 β 7 seront préparés.
- 2- Optimisation du procédé de fabrication des MPs avec des technologies de microfluidique et de séchage pour améliorer leur stabilité et faciliter la transposition d'échelle.
- 3- Évaluation préclinique de la sécurité et de l'efficacité des MPs chargées en pARNi par rapport aux produits biologiques conventionnels et élucidation de la relation dose-réponse. Des combinaisons de MPs seront également réalisées pour délivrer simultanément 2 pARNi différents ciblant TNF α /IL12-23 ; TNF α /IL-23 ; TNF α / α 4 β 7 ; α 4 β 7/IL12-23 et α 4 β 7/IL23.

III- Méthodologie

WP1 : Conception de LNP chargées en pARNi (M1-M36)

Tâche 1.1 : synthèse des pARNi

Les ARN cibles seront TNF α , IL12-23 (p40), IL23 (p19), IL12 (p35) et α 4 β 7. Les pARNi seront ensuite synthétisés par transcription *in vitro*. Les pARNi produits seront quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop. Enfin, les pARNi conçus seront analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Tâche 1.2 : Préparation des LNPs chargées en pARNi

Les LNPs seront préparées par une méthode de déplacement de solvant. Le pARNi sera piégé électrostatiquement dans les LNPs avec un lipide ionisable, à pH acide. La taille des LNPs sera mesurée par diffusion de la lumière.

Tâche 1.3 : Évaluations *in vitro* des pARNi libres et des LNPs chargées en pARNi

Le pARNi libre associé à un agent de transfection ou chargé dans des LNPs sera testé en utilisant des cultures de cellules immunitaires qui seront sélectionnées en fonction de la protéine cible (macrophages dérivés de cellules THP-1, lymphocytes).

WP2 : Optimisation du processus de fabrication des MPs (M1-M36)

Tâche 2.1 : Microencapsulation automatisée de LNPs chargées en pARNi à l'aide d'un procédé microfluidique

Les MPs protègent les LNPs chargées en pARNi des dégradations acides et enzymatiques dans l'estomac et les libèrent au pH entérique. La méthode actuelle de microencapsulation sera optimisée en utilisant un dispositif de mélange microfluidique. Cela permettra la production automatisée de MPs en une seule étape et facilitera la transposition d'échelle en vue d'un transfert clinique potentiel.

Tâche 2.2 : Stabilité de la microsuspension : Comparaison de deux méthodes de séchage transposables à l'industrie

Les procédés de séchage par atomisation et lyophilisation améliorent la stabilité à long terme des préparations [8]. Ces deux procédés seront testés et comparés afin de sélectionner celui qui permettra la plus grande stabilité des MPs dans des conditions de conservation contrôlées et répondant aux exigences des autorités sanitaires.

WP3 : Évaluations précliniques dans des modèles murins de colite (M12-M36)

Tâche 3.1 : Évaluations *in vitro*

Afin de reproduire le devenir des MPs après administration orale, les MPs seront incubées dans des liquides gastriques et intestinaux simulés. Après lavage, l'activité des MPs "digérées" sera évaluée dans des monocultures cellulaires définies dans la tâche 1.3.

Tâche 3.2 : Évaluations *in vivo*

Les MPs chargées en pARNi seront administrées par gavage et les produits biologiques (influximab, vedolizumab et ustekinumab), par voie intrapéritonéale (IP). La colite sera induite chez les souris avec une solution de sulfate de dextran sodique (DSS) ou du TNBS. La sévérité de l'inflammation intestinale sera évaluée par l'indice d'activité de la maladie (DAI), le niveau de lipocaline fécale 2 (Lcn-2) et les scores histologiques. Une coloscopie sera réalisée et la perméabilité intestinale sera évaluée par gavage au FITC-Dextran et par quantification de la concentration plasmatique de LPS [9], [10]. Les profils immunitaires de certaines souris seront évalués sur le côlon, l'intestin grêle, les ganglions lymphatiques mésentériques et la rate, par cytométrie en flux. En outre, des échantillons de sang seront prélevés pour quantifier les marqueurs de la toxicité potentielle des MP sur les fonctions rénales et hépatiques (GGT, PAL). Un mélange de molécules contenant différents pARNi (TNF α /IL12-23 ; TNF α /IL-23 ; TNF α / α 4 β 7 ; α 4 β 7/IL12-23 et α 4 β 7/IL23) sera ensuite administré afin d'agir simultanément sur différentes cibles.

[1] M. Zhao *et al.*, 2021, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjab029. [2] J. Marsal *et al.*, 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.897936. [3] L. Kassouri *et al.*, doi: 10.1016/j.dld.2020.07.031. [4] P. Sousa *et al.*, 2015, doi: 10.1097/MOG.000000000000191. [5] A. Lamprecht *et al.*, 2001. doi:10.1016/j.ejpb.2016.01.002 [6] B. Caron *et al.*, 2022, doi: 10.1080/14712598.2022.1985999. [7] L. Peyrin-Biroulet *et al.*, 2019, doi: 10.1016/j.autrev.2018.07.014. [8] C. M. Zimmermann *et al.*, 2022, doi:10.1016/j.jconrel.2022.09.021. [9] D. Arnone *et al.*, 2021, doi: 10.3389/fnut.2021.758518. [10] B. Chassaing *et al.*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0044328.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat) :

- Projet maturation SATT SAYENS : RNAMicrocaps
- Fonds propres

- Connaissances et compétences requises :

- 1- Technologie Pharmaceutique

- 2- Biologie moléculaire
- 3- Biologie cellulaire

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent principalement la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Malgré une large gamme de médicaments anti-inflammatoires, les traitements actuels rencontrent des problèmes d'efficacité, de résistance ou de toxicité. Le projet vise à développer une nouvelle stratégie anti-inflammatoire consistant en l'administration orale de petits ARN interférents (pARNi) afin d'inhiber l'expression de cytokines (TNF- α , IL12, IL23) et/ou d'intégrine (α 4 β 7), impliquées dans la réponse inflammatoire. Cette approche utilisera une technologie innovante basée sur des nanoparticules lipidiques conçues pour la transfection de pARNi et incorporées dans des microparticules gastrorésistantes. L'administration orale d'acides nucléiques présente de nombreux avantages par rapport aux biomédicaments : (i) réduction des effets indésirables grâce à l'absence d'effet systémique ; (ii) réduction de l'immunogénicité par rapport aux anticorps ; (iii) mise en place d'une « stratégie multicibles » en codéveloppant plusieurs pARNi dans un seul produit. Trois objectifs spécifiques sont prévus dans ce projet. Premièrement, des pRNAi agissant sur des cibles d'intérêt seront synthétisés et encapsulés dans des nanoparticules lipidiques conçues pour la transfection. Deuxièmement, les microparticules seront optimisées afin de répondre aux exigences réglementaires et cliniques, à partir d'un procédé de fabrication transposable industriellement. Enfin, l'efficacité des microparticules à base de pARNi sera comparée aux biomédicaments dans des modèles animaux de colite. Les microparticules seront aussi associées pour inhiber simultanément l'expression de plusieurs protéines telles que le TNF- α /IL23 ou TNF- α /IL12-23.

Inflammatory bowel diseases (IBD) mainly comprise Crohn's disease and ulcerative colitis. Despite a broad range of anti-inflammatory medications, current treatments face issues of effectiveness, resistance, or toxicity. The present project aims to develop an innovative anti-inflammatory strategy consisting of orally delivered small interfering RNA (siRNA) to inhibit the expression of cytokines (TNF- α , IL12, IL23) and/or integrin (α 4 β 7), involved in the inflammatory response. This approach will be set up using a novel technology consisting of lipid nanoparticles designed for siRNA transfection and embedded in gastroresistant microparticles. The oral delivery of nucleic acids offers numerous advantages compared to biologics: (i) reduced adverse effects due the lack of systemic effect; (ii) reduced immunogenicity in contrast to antibodies; (iii): "multitarget strategy" implementation by co-delivering different siRNA in a single product. Three specific objectives will be achieved. Firstly, siRNA acting on targets of interest will be designed and encapsulated in lipid nanoparticles designed for the transfection. Secondly, the microparticles will be optimized to meet regulatory and clinical requirements using an industrially scalable manufacturing process. Finally, the siRNA-based microparticles will be challenged with biologics in colitis animal models. Microparticles will be also combined to concurrently inhibit the expression of several target proteins such as TNF- α /IL23 or TNF- α /IL12-23.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

Biologie Santé, médecine humaine, vétérinaire
--

Mots clés : Microparticules, nanoparticules, petit ARN interférent, inflammation