

**Titre de la thèse – Thesis title:**

**Co-vectorisation d'acides nucléiques et de chimiothérapie pour potentialiser le traitement du cancer du sein triple négatif**

**Co-vectorisation of nucleic acids and chemotherapy for triple negative breast cancer therapy potentiation**

**Mots-clés – Key words:**

Nanovecteurs magnétiques, SPION, siRNA, doxorubicine, formulation, évaluation biologique

Magnetic nanovectors, SPION, siRNA, doxorubicin, formulation, biological evaluation

**Informations administratives :**

Nom du directeur de thèse : [Stephanie DAVID](#)

Co-directeur de thèse : [Katel HERVE-AUBERT](#)

Unité, Equipe : **EA6295 Nanomédicaments et Nanosondes**, Université de Tours  
(<https://nmns.univ-tours.fr>)

Filière de rattachement : E de l'ED SSBCV

Financement du 01-10-2022 au 30-09-2025 bourse Région Centre-Val de Loire

Employeur Université de Tours

Email de l'encadrant : [stephanie.david@univ-tours.fr](mailto:stephanie.david@univ-tours.fr), [katel.herve@univ-tours.fr](mailto:katel.herve@univ-tours.fr)

**Pour candidater veuillez nous envoyer un CV, une lettre de motivation et l'ensemble des relevés de notes depuis le baccalauréat. Date limite de candidature: 05/04/2022**

**To apply, please send us a CV, a motivation letter and all transcripts from the baccalaureate. Application deadline: 05/04/2022**

**Profil et compétences recherchées – Profile and required skills :**

Le (la) candidat(e) devra posséder des compétences en nanomédecine, notamment avoir des connaissances en synthèse, formulation et caractérisation des nanovecteurs. De plus, le (la) candidat(e) sera amené à évaluer l'efficacité de ces nanovecteurs sur des modèles cellulaires (voir animale) de Cancer du sein triple négatif. Des connaissances en biologie cellulaire et moléculaire seront également appréciées. Une formation de Pharmacien sera un plus.

The candidate should have skills in nanomedicine, including knowledge of synthesis, formulation and characterization of nanovectors. In addition, the candidate will be required to evaluate the effectiveness of these nanovectors on cell models (and perhaps also animal models) of triple negative breast cancer. Knowledge of cellular and molecular biology will also be appreciated. Pharmacist training will be a plus.

## **Résumé - Abstract:**

Les cancers du sein triple négatifs (CSTN) représentent le sous-type de cancer du sein le plus agressif avec un pronostic sombre, principalement lié à l'existence de clones chimiorésistants dotés de propriétés métastatiques accrues.<sup>1,2</sup> Les petits ARN interférents (siRNA) sont un outil prometteur pour inhiber la synthèse de protéines spécifiques et sont de plus en plus utilisés dans la recherche pour de nouveaux traitements anticancéreux. Une approche est d'utiliser des siRNA pour inhiber l'expression de protéines impliquées dans les mécanismes de chimiorésistance (transporteurs ABC, protéines anti-apoptotiques).<sup>3</sup> L'utilisation de nanovecteurs permet de potentialiser leur efficacité en assurant leur protection contre la dégradation dans le sang et en favorisant leur accès au compartiment cytoplasmique.<sup>4</sup>

L'équipe EA6295 NanoMédicaments et NanoSondes a récemment développé des nanovecteurs efficaces pour délivrer des siRNA dans des cellules de CSTN et dans des cellules de cancer du poumon.<sup>5-7</sup> Une combinaison de ces nanovecteurs de siRNA (NV-si) avec une chimiothérapie non-vectorisée (doxorubicine ou cisplatine) permet de potentialiser les effets de la chimiothérapie. Des nanovecteurs efficaces pour délivrer de la doxorubicine (NV-DOX) ont également été développés.<sup>8,9</sup> Ces NV-DOX ne permettent pas de potentialiser les effets thérapeutiques de la doxorubicine, mais de réduire les effets secondaires hématotoxiques.<sup>10</sup>

Ce projet de thèse vise à combiner ces deux approches et de (i) développer une formulation injectable pour co-vectoriser la doxorubicine avec des siRNA, (ii) déterminer un protocole de traitement efficace *in vitro* sur un modèle de CSTN utilisant une ou plusieurs séquences de siRNA visant des protéines impliquées dans la chimiorésistance et (iii) valider le choix du schéma thérapeutique sur un modèle orthotopique du CSTN chez la souris.

Triple negative breast cancers (TNBC) represent the most aggressive breast cancer subtype, with a poor prognosis, mainly linked to the existence of drug-resistant clones with increased metastatic properties.<sup>1,2</sup> Small interfering RNAs (siRNA) are a promising tool for inhibiting the synthesis of specific proteins and are increasingly used in research for new cancer treatments. One approach is to use siRNA to inhibit the expression of proteins involved in chemoresistance mechanisms (ABC transporters, anti-apoptotic proteins).<sup>3</sup> The use of nanovectors makes it possible to potentiate their efficiency by ensuring their protection against degradation in blood and promoting their access to the cytoplasmic compartment.<sup>4</sup>

The EA6295 NanoMedicines and NanoProbes team recently developed efficient nanovectors to deliver siRNA in TNBC and in lung cancer cells.<sup>5-7</sup> A combination of these siRNA nanovectors (NV-si) with non-vectorized chemotherapy (doxorubicin or cisplatin) makes it possible to potentiate the chemotherapy effects. Efficient nanovectors for doxorubicin delivery (NV-DOX) have also been developed.<sup>8,9</sup> These NV-DOX do not potentiate the therapeutic effects of doxorubicin but reduce the hematotoxic side effects.<sup>10</sup>

This thesis project aims to combine these two approaches and to (i) develop an injectable formulation for doxorubicin and siRNA co-vectorization, (ii) determine an effective treatment protocol *in vitro* on a TNBC model using one or more siRNA sequences targeting proteins involved in chemoresistance and (iii) validating the choice of the therapeutic regimen on an orthotopic TNBC mice model.

### **Thématique :**

L'hétérogénéité des cancers du sein triple négatifs (CSTN), les options de traitements limitées et l'existence de clones chimiorésistants soulignent le besoin de nouvelles options thérapeutiques.<sup>1,2</sup> Une approche est d'utiliser des petits ARN interférents (siRNA) pour inhiber la synthèse de protéines impliquées dans la chimiorésistance (p.ex. transporteurs ABC : MRP1, ABCG2, MDR1 ou protéines anti-apoptotiques ou inhibant l'apoptose : Bcl-xL, Mcl-1, survivine).<sup>3</sup> La nanovectorisation permet de potentialiser l'action des siRNA et de les délivrer dans le cytoplasme des cellules cancéreuses.<sup>4</sup> La doxorubicine est largement utilisée dans le traitement du CSTN, cependant elle peut provoquer de nombreux effets secondaires (cardiotoxicité, myopathies...).<sup>11</sup> La co-vectorisation de la doxorubicine (DOX) avec des siRNA dirigés contre les protéines citées ci-dessus, permettrait de potentialiser l'action de la chimiothérapie et réduire ses effets secondaires.

The heterogeneity of triple negative breast cancers (TNBC), the limited treatment options and the existence of drug-resistant clones underline the need for new therapeutic options [1,2]. One approach is to use small interfering RNAs (siRNA) to inhibit the synthesis of proteins involved in chemoresistance (e.g. ABC transporters: MRP1, ABCG2, MDR1 or anti-apoptotic or apoptosis-inhibiting proteins: Bcl-xL, Mcl-1, survivin) [3]. Nanovectorization can potentiate the action of siRNAs and deliver them into the cytoplasm of cancer cells [4]. Doxorubicin is widely used in the treatment of TNBC, however it can cause many side effects (cardiotoxicity, myopathies, etc.) [11]. The co-vectorization of doxorubicin (DOX) with siRNA directed against the proteins mentioned above would potentiate the action of chemotherapy and reduce its side effects.

### **Domaine :**

Cette thèse s'inscrit dans le domaine de la conception et de l'évaluation biologique de nanovecteurs à base de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPION) co-délivrant la doxorubicine et des siRNA (NV-si-DOX). Ce sujet interdisciplinaire comportera une partie synthèse et fonctionnalisation de surface de SPION, une partie formulation, une partie caractérisations physico-chimiques et une partie évaluation biologique.

This thesis is in the field of the design and biological evaluation of nanovectors based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) co-delivering doxorubicin and siRNA (NV-si-DOX). This interdisciplinary subject will include a synthesis and surface functionalization part of SPION, a formulation part, a physico-chemical characterization part and a biological evaluation part.

### **Contexte :**

L'équipe EA 6295 NMNS a déjà démontré son savoir-faire dans le développement de Nanovecteurs (NV) à base de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPION) permettant de vectoriser de la DOX ou des siRNA.<sup>5,6,8,10</sup> De plus, il a aussi été démontré que des NV-siRNA Bcl-xL en combinaison avec de la DOX ou du cisplatine en solution permettaient de diminuer la prolifération des cellules du CSTN ou du cancer du poumon, tout en réduisant la dose de chimiothérapie utilisée. Cette thèse vise à développer une formulation injectable de NV-si-DOX permettant de co-délivrer la doxorubicine et des siRNA pour potentialiser les effets thérapeutiques de la doxorubicine et réduire ses effets secondaires.

The EA 6295 NMNS team has already demonstrated its know-how in the development of Nanovectors (NV) based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) for vectorizing DOX or siRNA [5,6,8, 10]. In addition, Bcl-xL NV-siRNA in combination with

DOX or cisplatin in solution have also been shown to reduce the proliferation of TNBC or lung cancer cells, while reducing the dose of chemotherapy used. This thesis aims to develop an injectable formulation of NV-si-DOX allowing the co-delivery of doxorubicin and siRNA to potentiate the therapeutic effects of doxorubicin and reduce its side effects.

### **Objectifs :**

Les objectifs de cette thèse sont de (i) développer une formulation injectable pour co-vectoriser la doxorubicine avec des siRNA, (ii) déterminer un protocole de traitement efficace *in vitro* sur un modèle de CSTN utilisant une ou plusieurs séquences de siRNA visant des protéines impliquées dans la chimiorésistance et (iii) valider le choix du schéma thérapeutique sur un modèle orthotopique du CSTN chez la souris.

The objectives of this thesis are to (i) develop an injectable formulation to co-vectorize doxorubicin with siRNA, (ii) determine an effective *in vitro* treatment protocol on a TNBC model using one or more siRNA sequences targeting proteins involved in chemoresistance and (iii) validate the choice of therapeutic regimen on an orthotopic model of TNBC in mice.

### **Méthode :**

Les NV-si-DOX seront synthétisés et formulés à partir des protocoles préalablement développés pour des NV chargés soit de DOX soit de siRNA et posséderont les propriétés suivantes : taille environ 100 nm, potentiel zêta proche de 0 à pH 7,4, absence de siRNA ou DOX libres. Dans un second temps, le protocole de traitement sera déterminé *in vitro* pour plusieurs séquences de siRNA cibles seuls ou en combinaison (MRP1, ABCG2, MDR1, Bcl-xL, Mcl-1, survivine). L'efficacité thérapeutique des différentes séquences de siRNA seront étudiées en évaluant la viabilité cellulaire, l'accumulation de la DOX dans la cellule et/ou l'induction d'apoptose sur des modèles cellulaires de CSTN (MDA-MB-231, MDA-MB-468). Les meilleures formulations seront testées *in vivo* sur un modèle orthotopique de CSTN chez la souris.

NV-si-DOX will be synthesized and formulated using protocols previously developed for NV loaded either with DOX or siRNA and will have the following properties: size approximately 100 nm, zeta potential close to 0 at pH 7.4, absence of free siRNA or DOX. Secondly, the treatment protocol will be determined *in vitro* for several target siRNA sequences alone or in combination (MRP1, ABCG2, MDR1, Bcl-xL, Mcl-1, survivin). The therapeutic efficacy of the different siRNA sequences will be studied by evaluating cell viability, the accumulation of DOX in the cell and/or the induction of apoptosis on cellular models of TNBC (MDA-MB-231, MDA-MB-468). The best formulations will be tested *in vivo* on an orthotopic model of TNBC in mice.

### **Résultats attendus :**

Les résultats attendus de cette thèse sont (i) d'obtenir des formulations NV-si-DOX injectables qui permettront de potentialiser l'effet thérapeutique de la DOX et de réduire les effets indésirables, (ii) de déterminer les possibilités et limites de chargement d'actifs sur nos NP, (iii) de déterminer les facteurs importants pour un effet synergique entre siRNA et DOX et leur co-délivrance dans des cellules CSTN et (iv) de pouvoir par la suite transposer l'utilisation de ces vecteurs sur d'autres modèles de cancer ou d'applications en modifiant la séquence de siRNA et/ou l'agent anticancéreux.

The expected results of this thesis are (i) to obtain injectable NV-si-DOX formulations that will potentiate the therapeutic effect of DOX and reduce adverse effects, (ii) to determine the

possibilities and limits of loading active on our NP, (iii) to determine the important factors for a synergistic effect between siRNA and DOX and their co-delivery in TNBC cells and (iv) to be able to subsequently transpose the use of these vectors on d other cancer models or applications by modifying the siRNA sequence and/or the anti-cancer agent.

### **Références :**

1. Carey, L. A. *et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* **13**, 2329–2334 (2007).
2. Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W. & Yu, S.-C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res* **22**, 61 (2020).
3. O'Reilly, E. A. *et al.* The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin* **3**, 257–275 (2015).
4. Ben Djemaa, S., Munnier, E., Chourpa, I., Allard-Vannier, E. & David, S. Versatile electrostatically assembled polymeric siRNA nanovectors: Can they overcome the limits of siRNA tumor delivery? *Int J Pharm* **567**, 118432 (2019).
5. Ben Djemaa, S. *et al.* Formulation and in vitro evaluation of a siRNA delivery nanosystem decorated with gH625 peptide for triple negative breast cancer theranosis. *Eur J Pharm Biopharm* **131**, 99–108 (2018).
6. Bruniaux, J. *et al.* Magnetic nanocarriers for the specific delivery of siRNA: Contribution of breast cancer cells active targeting for down-regulation efficiency. *Int J Pharm* **569**, 118572 (2019).
7. Nguyen, P. V. *et al.* Targeted nanomedicine with anti-EGFR scFv for siRNA delivery into triple negative breast cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm* **157**, 74–84 (2020).
8. Gautier, J. *et al.* A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int J Pharm* **423**, 16–25 (2012).
9. Munnier, E. *et al.* Novel method of doxorubicin-SPION reversible association for magnetic drug targeting. *Int J Pharm* **363**, 170–176 (2008).
10. Gautier, J., Allard-Vannier, E., Burlaud-Gaillard, J., Domenech, J. & Chourpa, I. Efficacy and Hemotoxicity of Stealth Doxorubicin-Loaded Magnetic Nanovectors on Breast Cancer Xenografts. *J Biomed Nanotechnol* **11**, 177–189 (2015).
11. Cagel, M., Grotz, E., Bernabeu, E., Moreton, M. A. & Chiappetta, D. A. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today* **22**, 270–281 (2017).