

Nanovectorization par squalénisation d'agents anticancéreux dans les cancers à oncogènes de jonction

CNRS UMR 8203, Institut Gustave Roussy, Villejuif : JR Bertrand, A Deroussent, C Malvy, L Massade (coordinatrice), A. Paci, G. Urbinati
 CNRS UMR 8612, Faculté de Pharmacie, Châtenay Malabry : H Chapuis, S Lepêtre-Mouehli P Couvreur et D Desmaële.

Programme P2N, 2011

Contexte et résultats marquants

Notre projet s'inscrit dans la recherche de nouveaux traitements applicables à toutes les hémopathies et cancers solides et a pour objectif de déterminer si l'inhibition des produits des gènes de fusion oncogéniques par des petits ARN interférents (siRNA) peut conduire à une disparition des cellules tumorales ou à une resensibilisation des cellules tumorales à d'autres thérapies. Ce projet est mis en œuvre dans trois modèles de cancer solides porteurs de translocation : le cancer de la prostate (CaP), cancer le plus fréquent chez l'homme, porteur des gènes de fusion TMPRSS2-ERG dans 50% des cas, le cancer de la thyroïde (PTC) porteur des translocations chromosomiques RET/PTC retrouvées dans 60% à 80% des PTC et le sarcome d'Ewing porteur de la fusion EWS/Flil retrouvée dans 50% dans cette pathologie cancéreuse. Les séquences de fusion au niveau de l'ARN messager pour ces trois pathologies cancéreuses constituent une cible très spécifique pour les siRNA puisqu'elles sont exprimées uniquement dans la tumeur, ce qui va nous permettre de développer une approche thérapeutique très spécifique mettant en œuvre des quantités très faibles de principes actifs. Mais, le développement des siRNA comme molécule d'intérêt thérapeutique se heurte *in vivo* à des difficultés liées à leur administration. En effet, ces molécules ont un caractère très hydrophile qui ne leur permet pas de franchir les barrières biologiques rencontrées entre le site d'administration et le site d'action, d'où l'idée de les vectoriser. Dans cette perspective, les terpènes (ou isoprénoïdes) constituent un groupe de composés naturels extraordinairement diversifiés par leurs structures et leurs propriétés. Curieusement, ils n'ont jamais été utilisés auparavant dans le domaine de la nanomédecine pour vectoriser les médicaments, sauf très récemment par Patrick Couvreur qui est à l'origine du concept de « squalénisation ». **Notre objectif est d'utiliser l'extraordinaire capacité des dérivés squaléniques qui s'auto-assemblent en milieu aqueux en nanoparticules pour la conception de nanomédecines.** Cette méthodologie sera appliquée à des macromolécules (siRNA) mais aussi à de petites molécules (ifosfamide). L'ifosfamide sera combinée au siRNA EWS/Flil dans le but d'améliorer le traitement du sarcome d'Ewing. **A l'issue de ces études et en cas de succès, les applications sont immédiates.** A titre d'exemples, pour le sarcome d'Ewing, un cancer agressif et pour le cancer de la prostate qui représente la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme, nous espérons développer un nouveau traitement plus sûr. Pour le carcinome papillaire de la thyroïde, cette nouvelle technologie devrait être offerte aux patients atteints de métastases distantes résistantes à la radiothérapie métabolique.

Cancer papillaire de la thyroïde : Oncogènes RET/PTC

M Raouane, HM Ali, A Maksimenko, H Chapuis, D Desmaële, P Couvreur, L Massade

Contexte de l'étude : Les oncogènes de fusion RET/PTC1 (80%-70%) et RET/PTC3 (20%-30%) sont les variantes les plus fréquemment observées dans le carcinome papillaire de la thyroïde (PTC). Nous avons mis au point un siRNA efficace et spécifique de RET/PTC1 et l'avons vectorisé par la méthode de squalénisation pour le préserver de la dégradation. Nous avons montré l'efficacité de cette méthode *in vivo* mais le siRNA RET/PTC1-squalène (SQ) est incapable de franchir les barrières cellulaires *in vitro* (Raouane et al., J. Chem Med., 2011). **Dans le but d'améliorer l'internalisation cellulaire, nous avons ajouté un peptide fusogène le GALA-cholestérol (Chol-GALA) au siRNA RET/PTC1-SQ.**

A. Conjugaison du siRNA RET/PTC1 au squalène et caractérisation des nanoparticules

Échantillon	Size (nm)	zeta (mV)	Polydispersity index
siRNA RET/PTC1-SQ	130	-16.4	0.24
siRNA RET/PTC1-SQ GALA-Chol (N1/N1)	110.3	-15.4	0.14
siRNA RET/PTC1-SQ GALA-Chol (N2/N2)	149.3	-21.2	0.45
siRNA RET/PTC1-SQ GALA-Chol (N3/N3)	227	-24.2	0.43

Le bioconjugé siRNA RET/PTC1-SQ associé ou non au GALA-Chol est capable de s'auto-assembler dans l'eau pour donner des nanoparticules dont la taille augmente avec la quantité de GALA-Chol rajoutée.

B. Internalisation des nanoparticules dans la lignée BHP 10-3 issue de PTC

Les cellules sont incubées en présence de 50 nM de siRNA RET/PTC1 marqué (FAM, vert) sous forme libre ou nanoparticulaire. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Les cellules sont observées par microscopie à fluorescence.

Les NPs siRNA RET/PTC1-SQ-GALA-Chol sont capables de franchir les barrières cellulaires

C. Efficacité antitumorale des nanoparticules siRNA RET/PTC1 squalénées

BHP 10-3 Tumeur Cells (2X10⁶)

Les NPs siRNA RET/PTC1-SQ inhibent la croissance tumorale à des concentrations 5 fois plus faibles que celle utilisées dans d'autres études (0.5 mg/kg au lieu de 2.5 mg/kg) et diminuent l'expression de l'oncogène et de l'oncoprotéine RET/PTC1. En revanche, les NPs siRNA RET/PTC1-SQ GALA-Chol sont inefficaces *in vivo* probablement car elle s'agrègent dans la circulation sanguine.

Conclusion* :

Les nanoparticules de siRNA RET/PTC1-SQ sont accréditées comme thérapie efficace pour l'oncogène RET/PTC1 pour les futures applications *in vivo*.

Travaux en cours : Pour couvrir les variantes les plus fréquentes dans le PTC, des études sont en cours sur RET/PTC3. Nous avons établi une lignée qui exprime l'oncogène RET/PTC3, avons mis au point un siRNA efficace et spécifique de la jonction. Le siRNA RET/PTC3 est en cours de squalénisation pour les futures études *in vivo*.

* Raouane et al., Effects of silencing RET/PTC1 oncogene in papillary thyroid carcinoma by siRNA - squalene nanoparticles with and without fusogenic companion GALA-Cholesterol (à soumettre).

Cancer de la prostate : Oncogène TMPRSS2-ERG

G Urbinati, Q Rousseau, H Chapuis, D Desmaële, P Couvreur, L Massade

Contexte de l'étude : Le cancer de la prostate (CP) constitue la 3^{ème} cause de décès par cancer chez l'homme et est caractérisé dans 50% des cas, par des réarrangements chromosomiques affectant le gène ERG. Suite à une délétion interstitielle sur le chromosome 21, ce facteur de transcription oncogénique de la famille ETS fusionne avec la séquence promotrice de TMPRSS2 (sérine protéase transmembranaire de type II possédant des éléments de réponse aux androgènes) pour donner l'oncogène de fusion TMPRSS2-ERG. Huit variants TMPRSS2-ERG sont décrits, deux d'entre eux sont les plus fréquemment retrouvés chez les patients. Elles correspondent à la fusion de l'exon 1 de TMPRSS2 avec les exons 4 (type III, 54%) et 5 d'ERG (type IV, 2%) qui codent pour des protéines ERG tronquées (Figure 1). **Notre objectif est d'inhiber les produits de la fusion TMPRSS2-ERG par des siRNA et de montrer si cette thérapie ciblée peut conduire à une inhibition de la croissance tumorale après vectorisation par squalénisation.**

Principaux résultats obtenus :

La lignée cellulaire VCaP exprimant l'oncogène TMPRSS2-ERG a été utilisée. Après avoir mis la méthode de transfection au point, nous avons construit des oligonucleotides qui recouvrent les 8 variants TMPRSS2-ERG et avons retrouvé 6/8 variants (Figure 2A). Nous avons construit des siRNA pour les variants les plus exprimés (III et IV). Pour la variante III, 2 siRNA se sont avérés efficaces (Figure 2B). En ce qui concerne le type IV, un siRNA a été efficace, il inhibe fortement l'expression génique (respectivement 40% à 24h, 80% à 48h et 85% à 72h) et protéique. Les siRNA TMPRSS2-ERG type III A et B ainsi que le type IV sont capables de diminuer la prolifération cellulaire d'environ 50% et d'augmenter l'indice apoptotique dans les cellules VCaP. L'analyse par Microarray réalisée sur des cellules traitées avec les siRNA TMPRSS2-ERG type III A et B et IV par rapport au siRNA contrôle montrent la régulation des gènes apoptotiques.

Conclusion :

nous avons réussi à établir 3 siRNA efficaces contre l'oncogène TMPRSS2-ERG qui seront vectorisés par la méthode de squalénisation comme illustré ci-dessous.

Perspectives:

La figure ci-contre représente une autre méthode de squalénisation du siRNA TMPRSS2-ERG par Click Chemistry. Cette chimie sera comparée à celle déjà mise au point pour le siRNA RET/PTC1. Ensuite des études *in vitro* seront effectuées pour étudier l'internalisation des nanoparticules siRNA TMPRSS2-ERG, des études *in vivo* pour montrer leur activité antitumorale.

Sarcome d'Ewing : Oncogène EWS/Flil

JR Bertrand, M Pharm, D Desmaële, P Couvreur, C Malvy

Le sarcome d'Ewing est caractérisé par des réarrangements chromosomiques EWS/Flil responsables de cette pathologie cancéreuse. Nous avons mis au point des siRNA dirigés contre l'oncogène de jonction EWS/Flil et avons montré son efficacité et sa spécificité *in vitro* (Toub et al., Pharm Res, 2006). La vectorisation des siRNA est nécessaire pour accroître leur résistance aux nucléases dans les milieux biologiques et faciliter leur pénétration cellulaire. La squalénisation est une stratégie originale et efficace pour vectoriser les siRNA. **Nous proposons ici une méthode de squalénisation basée sur l'utilisation de squalène cationique formant des interactions non covalentes entre le siRNA et le squalène-NH₂ (SQ-NH₂) utilisé comme transporteur.**

Leurs caractéristiques sont :
 Taille : 181 nm PDI: 0,12
 Charge : +22 mV (potentiel zeta)

Les nanoparticules de SQ-NH₂ fixent efficacement les acides nucléiques avec une saturation pour des ratio de charge de NIP=4 pour les ODN et NIP=6 pour les siRNA. Ces résultats ont été obtenus par titrations d'une solution d'acide nucléique par des concentrations croissantes de SQ-NH₂. Les acides nucléiques libres sont quantifiés après leur coloration au bromure d'éthidium.

Mesure de la transfection de siRNA fluorescent après complexation avec le SQ-NH₂ à un ratio de charge NIP=6 sur les cellules NH3T3 EF (exprime EWS/Flil) après 4h d'incubation

Conclusions :

Le squalène cationique forme des nanoparticules en solution et se complexe efficacement avec les siRNA. Ce vecteur facilite la pénétration des siRNA dans les cellules et s'avère un bon candidat pour vectoriser les siRNA en inhibant l'expression de l'oncogène EWS/Flil.

Perspectives :

Les études *in vitro* d'efficacité du siRNA EWS/Flil associé au SQ-NH₂ sont en cours. Nous comparerons alors leur efficacité avec ces mêmes siRNA couplés de façon covalente au squalène par la méthode de « click chemistry » en cours de développement dans l'équipe de D Desmaële.

Activation de l'ifosfamide (IFO) en vue d'un traitement combiné par siRNA EWS/Flil et IFO dans le sarcome d'Ewing

L Lesueur, C Skarbak, A Seck, A Deroussent, A Paci

Contexte de l'étude : Le but de cette étude est de tester si la combinaison d'un agent alkylant l'ifosfamide, efficace sur un large spectre de pathologies cancéreuses, est capable de potentialiser l'activité anticancéreuse du siRNA EWS/Flil. Mais l'ifosfamide nécessite une activation métabolique par les cytochromes P-450 produisant des dérivés métaboliques toxiques qu'il faut contre-carer. D'où l'idée de le préactiver par oxydation anodique avant de le coupler au squalène (SQ).

Voies de synthèse du SQ-IFO et du SQ thio-IFO

Etude de la cytotoxicité par test MTS de l'IFO, SQ-IFO and SQ sur un panel de lignées cellulaires

Cellule (µM)	IFO	SQ-IFO	SQ
RMS-1 (Human rhabdomyosarcoma)	>200	11	75
RD (Human rhabdomyosarcoma)	>200	34	57
UW-479 (Human glioma)	>200	74	54
lan-5 (Human neuroblastoma)	>200	21	97
SKOS-2 (Human osteosarcoma)	>200	134	120
HGR-OV1 (Human ovarian carcinoma)	>200	65	75
KC7 (Human Ewing sarcoma)	>200	5	30
SKNS-1 (Human Ewing sarcoma)	>200	21	63
SKNS-2 (Human Ewing sarcoma)	>200	24	29

Conclusions :

La conjugaison de l'IFO au SQ permet de former des nanoparticules. L'IFO seul n'est pas métabolisé dans les lignées cellulaires étudiées et n'a pas d'effet cytotoxique. En revanche, sa squalénisation permet de produire un produit cytotoxique qui inhibe la croissance cellulaire.

Perspectives :

Le conjugué SQ thio-IFO sera testé sur les mêmes lignées. Le produit le plus efficace sera testé en combinaison avec le siRNA EWS/Flil en vue de montrer une potentialisation des effets.

Production scientifique (publications, brevets)
 -Raouane M, Desmaële D, Urbinati G, Massaad-Massade L, Couvreur P. Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery. **Bioconjug Chem.** 2012 Mar 15. PMID: 22372953 (highlighted in June 2012).
 - Ali HM, Urbinati G, Raouane M, Massaad-Massade L. "Significance and applications of nanoparticles in siRNA delivery for cancer therapy" **Expert Rev. Clin. Pharmacol.** 2012 Jul;5(4):403-12.

CONTACT :
 Liliane.massade@igr.fr
 Site web
 http://anr.nanosqualonc.com/

