

Axe NanoBioScience

Groupe Régulation Artificielle de l'Expression Génétique par les Oligonucléotides

Vectorologie et transfert de gènes

UMR 8121 CNRS

Claude MALVY

cmalvy@igr.fr

Activités recherches :

Notre groupe de recherche s'est concentré sur l'inhibition d'oncogènes de jonction au niveau de l'ARNm. Ces cibles présentent l'intérêt considérable de n'être présentes que dans la tumeur. Pour ce faire nous utilisons des oligonucléotides antisens et des siRNA vectorisés *in vivo* par des nanovecteurs afin de les protéger contre une dégradation rapide. Nos travaux ont été effectués sur le sarcome d'Ewing et sur le carcinome papillaire de la thyroïde. Les problématiques moléculaires, cellulaires et animales que nous avons développées pour ces deux cancers sont assez proches. Toutefois les résultats obtenus sont en partie différents et en fait complémentaires.

A) Le sarcome d' Ewing

1) Sélection d'un acide nucléique thérapeutique

Le but de notre groupe a été de sélectionner des molécules inhibant la jonction de type 1 de EWS/Fli-1 au niveau de l'ARNm et qui pourraient se révéler capables de passer en essai clinique. Comme inhibiteurs potentiels de cette jonction nous avons étudié des oligonucléotides antisens et des siRNA. Nous avons ainsi étudié un siRNA synthétique ciblant la jonction EWS/Fli-1 (Toub et al ; Pharm. Research 2006). En utilisant des fibroblastes murins exprimant l'oncogène humain EWS/Fli-1 nous avons constaté que ce siRNA est actif à la fois au niveau de cellules en culture (grâce aux lipides cationiques) et dans des tumeurs xéno-gréffées (grâce aux nanoparticules polymères). En utilisant des cellules humaines d'Ewing en culture nous avons montré en coopération avec Heinrich Kovar à Vienne (Autriche) que l'activité inhibitrice de ce siRNA est équivalente à celle de deux autres siRNA décrits dans la littérature (résultats non publiés). Cependant nous avons mis en évidence que l'oligonucléotide antisens structuré ciblant EWS/Fli-1 est plus spécifique que le siRNA quand on mesure l'activité inhibitrice non-désirée sur EWS (Villemeur et al, soumis pour publication). En conséquence nous pensons que l'oligonucléotide antisens structuré est plus prometteur pour un essai clinique que le siRNA. Les études que nous avons réalisées

montrent que les nanosphères polymères qui vectorisent l'oligonucléotide ne sont pas seulement des agents passifs protégeant l'oligonucléotide contre la dégradation mais jouent un rôle actif dans sa bio-distribution et dans son mécanisme d'action (va être soumis pour publication). Tout d'abord en présence de nanosphères l'oligonucléotide se concentre dans la tumeur. Ensuite de façon inattendue l'administration intraveineuse de l'oligonucléotide seul stimule la croissance tumorale. Cet effet est complètement aboli en présence des nanosphères où en contraste avec le résultat précédent la croissance tumorale est effectivement inhibée par l'oligonucléotide antisens mais pas par l'oligonucléotide contrôle. L'oligonucléotide antisens structuré inhibe la croissance de cellules d'Ewing d'origine humaine A673 en culture ce qui n'est pas le cas de l'oligonucléotide contrôle. En conséquence de ce résultat nous avons repris les expériences avec xénogreffes mais en utilisant cette fois les cellules humaines A673 et non les cellules murines exprimant l'oncogène humain

2) Le sarcome d' Ewing comme modèle d'étude d'agents de vectorisation d'acides nucléiques

-Les Nanocapsules

La grande majorité des vecteurs utilisés pour transporter des acides nucléiques dans les cellules est constituée de nanosphères cationiques permettant de fixer à leur surface les ODN par des interactions électrostatiques. Nous avons utilisé une nouvelle voie de vectorisation depuis les années 2000 avec les nanocapsules qui ont été élaborées dans le laboratoire de P. Couvreur (CNRS UMR 8612). Ces particules sont chargées négativement (potentiel zêta de l'ordre de -20 mV) et sont constituées d'un polymère d'isobutylcyanoacrylate à cœur aqueux. Ce cœur contenant les molécules encapsulées. Nous avons montré au laboratoire que ces capsules étaient capables de faire pénétrer des ODN et des siRNA dans les cellules et d'inhiber l'expression du gène visé tant *in vitro* que sur la croissance de tumeur xénogreffées sur un modèle de sarcome d'Ewing sur la souris "nude". Toutefois, le mode de préparation de ces nanoparticules rend difficile la transposition d'échelle de synthèse pour des applications pharmacologiques. En collaboration avec le laboratoire de P Couvreur une nouvelle méthode de préparation de nanocapsule à cœur aqueux a été proposée ([Hillaireau H, Le Doan T, Chacun H, Janin J, Couvreur P](#). Encapsulation of mono- and oligo-nucleotides into aqueous-core nanocapsules in presence of various water-soluble polymers. *Int J Pharm.* 2007 Mar 1;331(2):148-52). Avec ce nouveau type de nanocapsule, nous avons pu encapsuler efficacement des ODN et des siRNA (rendement de 98%) et inhiber *in vitro* l'expression du

gène EWS-Fli1 (J. Biton, Master 2, 2007). L'amélioration du protocole de préparation de ces nanocapsules nous a permis d'augmenter d'un facteur 5 l'inhibition obtenue (A-L Ramon, Master 2, 2008).

-Les peptides fusogènes

L'utilisation d'oligonucléotides à visée thérapeutiques se heurte à une difficulté importante constituée par leur faible capacité à franchir la membrane des cellules. L'utilisation de vecteurs particuliers comme les nanosphères ou les nanocapsules de PACA constitue des approches innovantes. Nous avons également exploré une autre voie basée sur la propriété de certains peptides à pouvoir franchir la membrane cellulaire. En collaboration avec le laboratoire du Pr M. Hollosi à Budapest nous avons synthétisé différents peptides fusogènes issus du Flock house virus ou de la pénétratine (peptides contenant des charges cationiques permettant de fixer l'oligonucléotide par voie électrostatique) et testé leur capacité à faire entrer des ODN dans les cellules. La pénétration de ces peptides a été étudiée après leur marquage par un dérivé de la coumarine et celle des ODN a été suivie après leur marquage à la fluorescéine. Nous avons montré par microscopie en épifluorescence que les peptides interagissaient avec les cellules et faisaient entrer l'ODN qui leur était associé. Les peptides forment spontanément en solution des agrégats avec les ODN qui ont pu être mis en évidence par transfert de fluorescence. Le taux d'expression d'EWS-Fli1 mesuré par RT-PCR a été diminué de 50% avec 300 nM d'ODN vectorisé par le peptide pénétratine, alors que dans les mêmes conditions l'ODN contrôle n'avait aucun effet. Cette étude est en cours de publication.

B) Le carcinome papillaire de la thyroïde.

En fonction des résultats ci dessus décrits pour le sarcome d'Ewing nous avons souhaité étendre ce type de recherche à d'autres maladies monogéniques dues à des réarrangements chromosomiques. C'est le cas du carcinome papillaire de la thyroïde. Nous avons ainsi développé un modèle de cellules NIH/3T3 comportant l'oncogène de fusion ret/PTC1. Ce réarrangement correspond à une réorganisation chromosomique présente sur le chromosome 10 trouvée dans les carcinomes papillaires de la thyroïde. Nous avons optimisé une séquence de siRNA ciblant la jonction ret/PTC1. *In vitro* nous avons obtenu une inhibition de l'expression de l'oncogène (>90%) et une réversion phénotypique (réorganisation des fibres d'actine).

Pour vectoriser *in vivo* ces siRNA nous avons adopté le même principe de nanosphères que précédemment décrit pour le sarcome d'Ewing mais en utilisant une chimie différente. La

surface des nanoparticules joue un rôle clef dans leur fonction et leur biodistribution. Pour vectoriser les acides nucléiques inhibiteurs nous avons donc choisi comme précédemment des nanoparticules décorées avec du chitosan. Le chitosan commercial est de très haut poids moléculaire : 200 kDa, ce qui le rend très visqueux et difficile à travailler. Nous l'hydrolysons donc avec du nitrite de sodium. Le chitosan qui en résulte a un poids moléculaire de 20 kDa. Après plusieurs tests de synthèse de nanoparticules nous avons été capables d'optimiser la préparation pour obtenir des nanoparticules très petites. Nous avons utilisé deux polymères biodégradables pour le cœur nanoparticulaire : Poly(isobutyl-cyanoacrylate) (PIBCA) et poly(isohexyl-cyanoacrylate) (PIHCA). En raison d'une polymérisation radicalaire initiée sur le polysaccharide, ces nanoparticules sont recouvertes de chitosan. Nous avons obtenu deux préparations différentes de nanoparticules monodisperses chargées positivement avec un diamètre hydrodynamique de respectivement 60 nm (PIBCA/chitosan) et 80 nm (PIHCA/chitosan). La mesure du potentiel zeta (+21 mV) confirme qu'en raison du recouvrement par le chitosan les nanoparticules sont chargées positivement. La microscopie électronique à transmission confirme que nous avons synthétisé une préparation de nanoparticules monodisperses et révèle une forme ronde, avec un diamètre après dessiccation de 20 nm (PIBCA/chitosan) et 30 nm (PIHCA/chitosan). De plus nous avons pu produire des nanoparticules marquées à la rhodamine en incorporant peu de temps après l'initiation de la polymérisation un monomère couplée à la rhodamine. Ces nanoparticules ont pratiquement les mêmes propriétés de surface que les nanoparticules non marquées à la rhodamine.

Le marquage radioactif du brin antisens avant l'hybridation du siRNA nous a permis de quantifier l'association du siRNA avec les différentes préparations de nanoparticules. Nous avons observé que des préparations de nanoparticules vieilles de 10 mois ont le même isotherme d'absorption que des suspensions fraîchement préparées. Ceci confirme la grande stabilité de ces nanoparticules.

Ces complexes ont été injectés par voie intratumorale et donnent une inhibition de croissance tumorale sur des souris « nude » pour lesquelles des cellules NIH/3T3 exprimant stablement l'oncogène de fusion ret/PTC1 ont été implantées sous forme de xenogreffe. Nous avons observé que la préparation PIBCA/chitosan donne une meilleure inhibition de croissance tumorale. Ce travail a été confirmé par la construction d'un plasmide d'expression comprenant un shRNA et permettant donc l'expression intracellulaire durable d'un siRNA. L'expression du shRNA dans des cellules stablement transfectées avec ce plasmide inhibe l'oncogène ret/PTC1. Ces cellules pour lesquelles ret/PTC1 est inhibé ne donnent pas de

tumeur après xenogreffe a la souris « nude » alors que des cellules exprimant un shRNA contrôle et exprimant ret/PTC1 donnent lieu à une tumeur.

Après marquage radioactif du siRNA nous n'avons pu voir aucune dégradation *in vivo* significative du siRNA vectorisé deux jours après l'injection intratumorale, alors que le siRNA non vectorisé est au minimum modifié après deux jours. L'association du siRNA avec nos nanoparticules les protège donc *in vivo* sinon de la dégradation du moins de modifications terminales. Ces résultats ont été publiés début 2008 dans *Nucleic Acid Reserach* (Martimprey et al, NAR, 2008). Un second article en cours de préparation, intitulé « Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the *in vivo* delivery of siRNA » sera centré sur la préparation et la comparaison des deux types de nanoparticules développées.

Pour augmenter la spécificité des nanoparticules nous avons essayé de fixer de façon covalente des anticorps à leur surface. Des résultats préliminaires montrent qu'il est possible de fixer une biotine PEGylée à leur surface, ce qui donne des possibilités variées d'ajouter différents lots de molécules via des complexes avidine/biotine.

Publications correspondantes au rapport

2004 Laczko I, Bottka S, Toth GK, Malvy C, Bertrand JR, Hollosi M. Interaction of fusogenic peptides with an antisense oligonucleotide in solution and in the presence of micelles: conformational studies. Biochem Biophys Res Commun. Jan 9; 313(2): 356-61

2005 Maksimenko A, Hélin B, Bertrand J.R, Gottikh M, Malvy C. Real-time detection and efficacy of antisense oligonucleotides delivered by PAMAM dendrimers in living cells. Jal of Drug Delivery Science and Technology. 15,1: 75-79

2005 Pille JY, Denoyelle C, Varet J, Bertrand JR, Soria J, Opolon P, Lu H, Pritchard LL, Vannier JP, Malvy C, Soria C, Li H. Anti-RhoA and Anti-RhoC siRNAs Inhibit the Proliferation and Invasiveness of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. Mol Ther. 11(2):267-74

2005 Bertrand JR, Maksimenko A, Malvy C. Short double-stranded ribonucleic acid as inhibitor of gene expression by the interference mechanism. Methods Mol Biol.;288:411-30.

2005 A. Maksimenko, C. Malvy : Oncogene targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing Sarcoma. Expert Opinion in Therapeutic Targets. 9(4): 825-830

2005 A. Maksimenko, M. Villemeur, H. Elhames, P. Couvreur, V. Polard, J.R. Bertrand, M. Aboubakar, M. Gottikh, C. Malvy. In vivo potentialities of EWS-FLI-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes. Annals of the New York Academy of Sciences.vol 1058, 2005

2006 N. Toub, J.R. Bertrand, A. Tamaddon, H. Elhames, H. Hillaireau, A. Maksimenko, J.

Maccario, C. Malvy, E. Fattal, P. Couvreur. Efficacy of siRNA-nanocapsules targeted against the EWS-FLI-1 oncogene in Ewing Sarcoma. Pharmaceutical Research. 23, 892-900

2006 N. Toub, J.R. Bertrand, C. Malvy, E. Fattal, P. Couvreur. Antisense oligonucleotides nanocapsules efficiently inhibit EWS-Fli-1 expression in a Ewing's sarcoma model. Oligonucleotides 16: 158-168

2006 I. Laczko, S. Bottka, Z. Balint, G. Varo, E. Illyes, E. Vass, M. Hollosi, J.R. Bertrand, C. Malvy: N-Terminal acylation of the SV40 nuclear localization signal peptide enhances its oligonucleotide binding and membrane translocation efficiencies. Archives of Biochemistry and Biophysics. 454 (2) : 146-54

2006 . P. Couvreur, R. Gref, K. Andrieux, C. Malvy: Nanotechnologies for drug delivery: Application to cancer and autoimmune diseases. Progress in Solid State Chemistry. 34: 231-235

2006 J.Y. Pille, E. Blot, J.R. Bertrand, A. Maksimenko, P. Opolon, L. Protchard, H. Lu, J.P. Vannier, J. Soria, C. Malvy, H. Li, C. Soria. Intravenous delivery of anti-RhoA siRNA loaded in nanoparticles of chitosan in mice: safety and efficacy in xenografted breast cancer. Human Gene Therapy 17 (10) : 1019-26

2006 N. Toub, C. Malvy, E. Fattal, P. Couvreur. Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. Biomedicine and Pharmacotherapy 60:607-620

2008 De Martimprey H, Bertrand JR, Fusco A, Santoro M, Couvreur P, Vauthier C, Malvy C. siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma. Nucleic Acids Res. Jan;36(1):e2. Epub 2007 Dec 13

Contrats 2003-2008

2004-2005. **Fondation de l'Avenir**: Validation et étude pharmacocinétique chez la souris de complexes nanosphères polymériques oligonucléotides antisens ciblées contre EWS-Fli-1 dans le sarcome d'Ewing. 20000 euros

2005-2008. Partenaire du **STREP européen Prothets**: Prognosis and Therapeutics targets in the "Ewing" family of Tumours. 100000 euros sur 3 ans 6 mois.

2006: BQR de l'Université Paris-Sud: **Apport des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) recouvertes de polysaccharides pour la vectorisation de siRNA dans le cas du traitement du carcinome papillaire de la thyroïde**. 13000 euros