



Nouvelles approches ciblées pour le traitement des tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing

Anne-Laure Ramon

► To cite this version:

Anne-Laure Ramon. Nouvelles approches ciblées pour le traitement des tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114815 . tel-00840226

HAL Id: tel-00840226

<https://theses.hal.science/tel-00840226>

Submitted on 2 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

ANNÉE 2011- 2012

SÉRIE DOCTORAT N°1170

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 06/06/2012

par

Anne-Laure RAMON

Nouvelles approches ciblées pour le traitement des tumeurs de la famille du sarcome
d'Ewing

Directeurs de thèse :

Christine VAUTHIER

DR (UMR 8612 Physico-Chimie,
Pharmacotechnie et Biopharmacie)
Professeur (Université Paris-Sud XI)

Claude MALVY

Composition du jury :

Président du jury :

Patrick COUVREUR

Professeur (Université Paris-Sud XI)
Professeur (University of Utah, USA)
CR (INSERM UMR S938, UPMC)
CR (INSERM UMR 830, Université
Descartes)

Rapporteurs :

Hamid GHANDEHARI

Jean-Christophe FRANCOIS

Examineur :

Franck TIRODE

Directeurs :

Christine VAUTHIER

DR (UMR 8612 Physico-Chimie,
Pharmacotechnie et Biopharmacie)
Professeur (Université Paris-Sud XI)

Claude MALVY

J'entendis la locomotive du Denver-Rio Grande hurler dans la montagne.

J'avais envie de poursuivre plus loin mon étoile.

Jack Kerouac-Sur la route

Aux membres de ma très grande ma famille

Les présents, comme les absents

Pour leur soutien de toujours

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de Physico-chimie, pharmacotechnie et biopharmacie (UMR CNRS 8612) de la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry Université Paris XI et vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses (UMR CNRS 8203) de l'institut Gustave Roussy à Villejuif, sous la direction du Docteur Christine Vauthier et du Professeur Claude Malvy.

Mes premiers remerciements vont aux directeurs de mes laboratoires d'accueil pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires respectifs : Le Dr. LLuis Mir, directeur de l'UMR 8203 également pour avoir toujours fait preuve de bienveillance à mon égard ainsi que pour ses conseils avisés et pour m'avoir toujours prêté une oreille attentive . Le Pr. Elias Fattal, directeur de l'UMR 8612, pour sa sympathie mais aussi pour son rôle de professeur durant mes années d'étudiante en pharmacie, et pour m'avoir accepté au sein du master pharmacotechnie et biopharmacie sans quoi je ne soutiendrais pas ma thèse en formulation aujourd'hui.

Je tenais ensuite à remercier mes directeurs de thèse,

Le Dr Christine Vauthier, pour votre disponibilité tout au long de ces trois années, pour avoir libéré de votre temps pour répondre à mes questions lorsque cela a été nécessaire, pour vos conseils, et pour votre infinie patience durant la rédaction et les corrections de cette thèse.

Le Pr. Claude Malvy, pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, pour les discussions toujours très intéressantes. Merci également pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordées pendant ces trois années. Merci

également de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès et de rencontrer d'autres chercheurs.

Mes remerciements au Professeur Ghandehari et au Dr. François pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie aussi sincèrement le Pr. Couvreur pour avoir m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse malgré ses nombreuses obligations ainsi que le Dr. Tirode pour sa présence en tant qu'examineur.

Je remercie également le Dr. Jean-Rémi Bertrand pour sa présence quotidienne au laboratoire et ses astuces bien utiles et bien souvent originales et surtout pour m'avoir, il y a presque 5 ans, inculqué les bases de la recherche, tout spécialement dans le domaine de la biologie.

Mes remerciements les plus sincères à L'Association Leyla, et particulièrement à Jean-Michel et Cécile Karam pour m'avoir fait confiance et avoir financé ce travail. Et plus généralement merci à l'ensemble du conseil scientifique pour la sympathie dont ils ont fait part à mon égard.

Une dédicace toute spéciale aux membres de mes deux unités d'accueil, ainsi qu'aux stagiaires impliqués dans ce projet : Guillaume Hermant, Cécile Vauléon et Thininane Chaou.

Pour l'unité 8612, je tiens à remercier le Professeur Ponchel pour sa grande bienveillance à mon égard. Merci également aux membres de l'équipe : Kawtar, Christelle, Van, Sylvia, Olivier, Laura, Freimar, Donato, ainsi qu'aux stagiaires pour leur sympathie et pour m'avoir toujours libéré un bout de paillasse. Mais aussi merci aux autres étudiants du laboratoire, notamment aux participants d'ULLA 2012 à

Parme, qui a été une semaine extraordinaire ! Mention spéciale également à Nicolas Huang, le plus « étudiant » des maîtres de conf'.

Pour l'UMR 8203, merci à tous les étudiants (et aux autres): Aude, Marie-Amélie, Marie B., Marie G, Christophe, Franck, Julien, Vanessa, Isabelle, Ysabel, Elodie, Gaétan, Christian, Najat, Georgia, Emilie Gobbo, Bassim (Merci merci merci merci pour le coaching en manipulation de souris !), (B)Atmane (!), et Léa....Continuez les apéros ;-) !

A l'institut Gustave Roussy je voudrai également remercier tous les membres de plateformes (PCR, animalerie, imagerie) qui ont grandement facilité ce travail et m'ont accordé leur amitié. Je tiens à remercier tout spécialement Mélanie Polrot (animalerie), Olivia Bawa (Imagerie) et Valérie Rouffiac (Imagerie/IVIS).

Un remerciement tout particulier à ma famille qui, bien au delà de ses trois années, durant toute ma vie, a toujours su se montrer encourageante. Vous m'avez permis de toujours viser plus haut en montrant une confiance en ma réussite souvent plus grande que la mienne.

Merci aussi à mes amis, pour vous être intéressés à ce domaine bien obscur, pour m'avoir écoutée dans les bons et les mauvais moments, pour avoir décalé de nombreuses séances de ciné au gré de mes manips et de mes horaires « spéciaux ». Un merci tout particulier à Truc, Guillaume, Christelle, Alex, Florent, Christophe, Willy et Anastasia. Plus de 10 ans pour les uns, quelques années seulement pour les autres mais un seul mot: MERCI !!!

Enfin, je voudrai remercier une personne qui a été extrêmement importante pour moi durant ces trois années : Anna Al Haddad. Sans ton soutien de copine de bureau, tes conseils, ton oreille attentive sur mes problèmes en tous genres et tout le reste je ne suis pas sûre de ce que je serai devenue. Merci aussi d'avoir si joyeusement accepté ma musique H24 dans le labo :-D et longue vie à la pause pomme de 16h !

Sommaire

Introduction générale	9
1. Le sarcome d'Ewing	10
1.1. Historique et épidémiologie	11
1.2. - Caractéristiques biologiques	13
1.2.1. Origine tissulaire	13
1.2.2. Altérations géniques.....	14
1.2.3. Marqueur cd99/mic2	18
1.3. - Diagnostic du sarcome d'Ewing	20
1.4. - Stratégies thérapeutiques standards	21
1.5. - Avancées thérapeutiques récentes et essais cliniques en cours	23
1.5.1. Antiangiogéniques	23
1.5.2. Petites molécules inhibitrices de kinases	24
1.5.3. Inhibiteurs d'IGF-1	25
1.5.4. Inhibiteurs de m-TOR.....	27
1.5.5. Inhibiteurs spécifiques d'EWS/Fli-1	28
1.5.6. Anticorps anti-Cd99.....	31
1.5.7. Autres avancées thérapeutiques	32
2. - L'ARN interférence.....	33
2.1. – Découverte.....	33
2.2. – Mécanisme.....	34
2.3. Effets secondaires des siRNA	35
2.3.1. Effets off-Target	35
2.3.2. Immunostimulation	36

2.4. Applications au sarcome d'Ewing	38
2.4.1. Culture cellulaire	38
2.4.2. Résultats <i>In vivo</i>	41
1.1. - Essais cliniques en cours dans le domaine du cancer.....	41
2. Conclusion	43
3. - Bibliographie:	46

Première partie : Choix d'une séquence de siRNA dirigée contre EWS/Fli-1 57

1. Introduction	58
2. Material and methods.....	64
2.1. Cell treatment for q-RT-PCR, western blot analysis of EWS/fli-1 and MTT testing	64
2.2. Cell treatment for apoptosis and cell cycle analysis	64
2.3. q-RT-PCR analysis	65
2.4. Western Blot analysis	66
2.5. MTT.....	66
2.6. Nuclear staining.....	67
2.7. Cell cycle analysis	67
2.8. Annexin V analysis	67
2.9. Caspase involvement in cellular death.....	68
3. Results	69
3.1. EWS/Fli-1 mRNA and protein inhibition	69
3.2. Effect of treatment with siRNA on the cell cycle of tumor cells:	70
3.3. Effect of the treatment with siRNAs on the ability of A673 and TC71 cells to evade apoptosis	72

3.4. Highlighting the molecular basis of cell death of tumor cells after treatment with siRNA.....	75
4. Discussion.....	77
5. Conclusion and outlooks	81
6. Bibliography	83

Deuxième partie : Mise au point et évaluation d'un nanovecteur dirigé contre les cellules sur sarcome d'Ewing..... 87

1. Introduction	91
2. Material and methods.....	92
2.1. Material	92
2.2. Methods	93
2.2.1. Synthesis of PIBCA/Chitosan nanoparticles by Redox Radical Emulsion Polymerization.....	93
2.2.2. Preparation of the immunonanoparticles.....	94
2.2.3. Nanoparticle Characterization.....	95
2.2.3.1. Particle Size	95
2.2.3.2. Zeta Potential	95
2.2.3.3. Transmission electron microscopy.....	96
2.2.3.4. siRNA labelling and adsorption onto nanoparticles	96
2.2.3.5. Activation of the complement system.....	96
2.2.4. Characterization of the functionality of the biotin grafted onto PIBCA/Chitosan nanoparticles and on the antibodies	97
2.2.5. Characterization of the immunonanoparticles: Biotin-avidin specific recognition	98
2.2.6. Evaluation of the cytotoxicity of the nanoparticles	99

2.2.7. Characterization of the expression of the glycoprotein cd99 expression on the Ewing sarcoma cell lines	100
2.2.8. Efficient recognition of the cd99 membrane protein by the immunonanoparticles	100
2.3. <i>In vivo</i> efficiency of the immunonanoparticles.....	101
2.3.1. Tumor growth inhibition.....	101
2.3.2. Measurement of EWS/Fli-1 inhibition	101
2.4. General <i>in vivo</i> tolerance of the nanoparticles	103
3. Results	103
3.1. Preparation of the immunonanoparticles	103
3.1.1. Nanoparticle biotinylation.....	104
3.1.2. Biotinylation of the anti-cd99 antibody.....	106
3.1.3. Evaluation of the coupling efficiency of the biotinylated antibody and of the PIBCA/chitosan nanoparticles	107
3.2. Characterisation of the nanoparticles	108
3.2.1. Size	108
3.2.2. Morphology.....	109
3.3. <i>In vitro</i> evaluation of the nanoparticles	110
3.3.1. Adsorption of siRNA onto nanoparticles.....	110
3.3.2. Activation of the complement system.....	111
3.3.3. Evaluation of the cytotoxicity of nanoparticles	112
3.3.4. Evaluation of the Cd99 expression on different Ewing sarcoma cell lines	113
3.3.5. Confocal microscopy analysis.....	114
3.4. <i>In vivo</i> evaluation of the nanoparticles.....	115

3.4.1. <i>In vivo</i> efficacy of the nanoparticles to target siRNA against Ewing's sarcoma tumors xenografted in mice.....	115
3.4.2. <i>In vivo</i> toxicity of the nanoparticles.....	116
4. Discussion.....	119
5. Conclusion:	121
6. Bibliography:	123
Troisième partie : Interactions nucléotides/nanoparticules.....	125
1. Introduction	126
2. Materials and methods	127
2.1. Materials	127
2.2. Methods	128
2.2.1. Synthesis of the nanoparticles	128
2.2.2. Biotinylation of the nanoparticles	129
2.2.3. Zeta potential of nanoparticles loaded with siRNA	130
2.2.4. Radiolabeling and complexation of siRNAs with nanoparticles	130
2.2.5. Distribution of the radiolabeled siRNA complexed with nanoparticles	130
3. Results and discussion.....	131
3.1. Complexing of the ODN and siRNA with the nanoparticles.....	131
3.2. Effects of the rhodamine labeling of the nanoparticles on the complexation with siRNA	132
3.3. Association of siRNA with biotinylated and rhodamine labeled nanoparticles	133
3.4. <i>In vivo</i> biodistribution of radiolabeled siRNA complexes / nanoparticles	135
4. Conclusion	138
5. Bibliography	139

Quatrième partie : Imagerie *in vivo* chez la souris 141

1. Introduction	142
2. Matériel et méthodes	146
2.1. Préparation de lignées cellulaires transfectées par un plasmide codant pour la protéine fluorescente mCherry	146
2.1.1. Transfection du plasmide mCherry dans les lignées cellulaires d'Ewing et sélection des clones	146
2.1.2. Vérification en PCR de la présence de mCherry dans les clones sélectionnés	147
2.2. Test de tumorigénicité des lignées transfectées	148
2.3. Validation du modèle TC71-mCherry IV	149
3. Effet dose des complexes nanoparticules/siRNA sur la lignée A673-mCherry implantée en sous cutané	149
3.1. Implantation des tumeurs et traitement des souris	149
3.2. Analyse des tumeurs en RT-qPCR.....	150
3.3. Analyse des tumeurs par immunoprécipitation suivie d'un western-blot	150
3.4. Synthèse des nanoparticules	151
4. Résultats	152
4.1. Création et caractérisation des lignées TC71-mcherry et A673-mCherry. Evaluation de la tumorigénicité de ces lignées chez la souris nude.	152
4.2. Utilisation de tumeurs fluorescentes dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement avec des siRNA formulés sous forme de complexes avec des nanoparticules	155
4.3. Biodistribution des nanoparticules chez la souris	157
5. Discussion.....	159

6. Conclusion	163
7. Bibliographie	164
Discussion générale	165
1. Introduction	167
2. Discussion générale	167
2.1. Choix d'une séquence de siRNA dirigée contre EWS/Fli-1	167
2.2. Conception d'immunonanoparticules spécifiquement dirigées contre les cellules tumorales	171
2.3. Utilisation de l'imagerie de fluorescence chez la souris	177
3. Bibliographie :	180
Conclusion générale et perspectives	183
Annexes	191

Introduction générale

Le sarcome d'Ewing

1.1. Historique et épidémiologie

La famille des tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing (ESFT) comprend le sarcome d'Ewing (osseux et extraosseux), les sarcomes d'Ewing atypiques, les tumeurs primitives neuroectodermiques (PNET), les neuroépithéliomes et les tumeurs d'Askin [1].

Le sarcome d'Ewing a été décrit pour la première fois par le médecin James Ewing en 1921 dont il a décrit quelques unes des caractéristiques, comme l'existence de cellules rondes, la prédominance chez les adolescents, l'apparition de la maladie dans les os longs comme plats et plus fréquemment au niveau de la diaphyse que de l'épiphyse ainsi que l'utilisation de la radiothérapie comme traitement primaire (Ewing 1921). Le sarcome d'Ewing est un ESFT indifférencié (phénotype neuroectodermique peu exprimé) localisé dans les os principalement mais qui peut apparaître dans les tissus mous. Les tumeurs d'Askin sont des ESFT localisées au niveau de la cage thoracique [2]. Les ESFT des tissus mous sont des néoplasmes rares qui représentent environ 5% des sarcomes chez les adultes et 10 à 15% chez les enfants [3].

Globalement les ESFT sont des tumeurs à petites cellules rondes partageant des caractéristiques immunohistochimiques (cd99 surexprimé dans 90% des cas), génotypiques (translocation t (11;22) (q24;q12) dans 85% des cas) et phénotypiques (phénotype neuroectodermique) [1]. Les ESFT sont des cancers rares (3/1 000 000) principalement osseux mais dont 10 à 15% des occurrences ont lieu dans les tissus mous. Ils touchent principalement des individus jeunes, ainsi seuls 10% des cas sont

diagnostiqués chez des patients âgés de plus de 20 ans. Le pic d'incidence se situe vers 15-16 ans. Ce pic à l'adolescence peut être expliqué par les liens entre EWS/Fli-1 et l'activation de la signalisation par l'IGF-1 [4]. Les ESFT touchent également plus souvent les caucasiens que les autres groupes ethniques et plus souvent les garçons que les filles. En se basant sur le registre de l'US National Cancer Institute entre 1973 et 2004, Esiashvili *et al.* ont déterminé que 92% des patients diagnostiqués étaient caucasiens, et 61% de sexe masculin [5].

La survie des patients atteints dépend de l'extension de la maladie au moment du diagnostic. Ainsi les patients avec une maladie localisée ont une survie de plus de 60% à 10 ans, ceux présentant des métastases pulmonaires isolées ont une survie d'environ 40% alors que ceux présentant des métastases osseuses ou au niveau la moelle osseuse ont une survie à 10 ans de moins de 20%. Les métastases sont le plus souvent retrouvées dans les poumons (50%), dans les os (25%), et dans la moelle osseuse (20%).[5].

Les patients ayant souffert d'un ESFT sont parmi les patients atteints de cancers pédiatriques, ceux qui ont une plus forte probabilité de rechute tardive avec les astrocytomes. Ainsi, Wasilewski-Masker *et al.* reportent 13% d'incidence à 20 ans de ces récurrences [6]. Cependant parmi ces récurrences on ne peut toujours distinguer celles dues au cancer primaire de celles résultant du traitement initial. De plus les patients inclus dans cette étude ont été diagnostiqués entre 1970 et 1986, donc les résultats pourraient être différents avec des patients traités plus récemment et donc plus efficacement.

1.2. - Caractéristiques biologiques

1.2.1. Origine tissulaire

L'origine tissulaire du sarcome d'Ewing a été souvent débattue. En 1983, Aurias *et al.* ont montré que le sarcome d'Ewing est d'origine neuroectodermique, comme l'ensemble des tumeurs neuroectodermiques périphérique, y compris les neuroépithéliomes et les tumeurs d'Askin de la paroi thoracique [7].

L'hypothèse prédominante est que les ESFT pourraient dériver des cellules mésenchymateuses issues de la crête neurale ou du mésoderme [8].

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse sont permissives pour EWS/Fli-1 et son expression dans ces cellules induit un phénotype proche de celui du sarcome d'Ewing [9-10], l'expression de marqueurs associés aux ESFT, la dépendance à l'IGF-1 et l'induction ou la répression de gènes cibles de EWS/Fli-1 [11-12].

Le profil génique des cellules d'ESFT, leur phénotype proche de cellules neurales immatures ainsi que la possibilité de différenciation neurale plaide en faveur de cellules issues de la crête neurale [13-14]. Une étude sur des cellules souches dérivées de cellules issues de la crête neurale dans lesquelles EWS/Fli-1 a été exprimé a montré que la signature moléculaire obtenue était plus similaire à celle des cellules issues de la crête neurale que des autres tissus, y compris les cellules souches mésenchymateuses [15].

De plus les cellules souches issues de la crête neurale migrent facilement durant l'embryogenèse et les cellules mésenchymateuses sont dérivées de la crête neurale et migrent également facilement durant le développement embryonnaire. Ceci pourrait expliquer les localisations très variées retrouvées dans le sarcome d'Ewing [16-18].

1.2.2. Altérations géniques

L'identification des autres anomalies génétiques présentes dans les ESFT a permis de comprendre la biologie de ce type de tumeurs, d'en faciliter le diagnostic et d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'augmenter l'espérance de vie des malades.

Les tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing sont caractérisées par la présence de translocations impliquant le gène EWS et un membre de la famille des facteurs de transcription ETS (pour E-Twenty-six). La famille des facteurs de transcription ETS est la plus grande famille de facteurs de transcription chez les métazoaires et est impliquée dans la liaison à l'ADN. Les membres de la famille ETS (pour une revue complète sur les facteurs de transcription de la famille ETS voir :[19]), dont EWS, sont impliqués dans différents types de tumeurs (Tableau 1). Dans cette section nous détaillerons la principale anomalie retrouvée dans le sarcome d'Ewing ainsi que les gènes les plus importants régulés par EWS/Fli-1.

Le sarcome d'Ewing est caractérisé par la présence dans 85% des cas de la translocation réciproque t(11 ; 22) (q24;q12) découverte en 1983 par Turc-Carel *et al.* et Aurias *et al.* [7, 20-21]. D'autres partenaires de fusion sont possibles pour EWS (tableau 1). Ainsi dans 10-15% des cas, la translocation observée est t(21;12) (22;12) qui conduit au gène de fusion EWS-ERG. Dans les 1 à 5% restants d'autres translocations sont possibles, résultant de la fusion de EWS avec un membre de la famille ETS.

Des protéines de fusion de la même famille que EWS/Fli-1 sont présentes dans d'autres pathologies qui ne sont pas considérées comme appartenant aux ESFT, ce qui rend le ciblage de telles anomalies intéressant pour un panel de pathologies plus large. Parmi ces néoplasmes on trouve le sarcome à cellules claires ou mélanome

malin des tissus mous, le liposarcome myxoïde, les tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes, le chondrosarcome, la leucémie myéloïde aigue [22-23].

Delattre *et al.* ont montré que cette anomalie résulte en la fusion de la protéine EWS codant pour une protéine se liant à l'ARN (domaine de transactivation) et Fli-1, codant pour un facteur de transcription de la famille ETS (domaine de liaison à l'ADN) [24]. EWS/Fli-1 est un facteur de transcription chimérique qui induit la transformation de cellules NIH/3T3 [25] (figure 1) et est par conséquent considéré comme un oncogène. Malgré son rôle en tant qu'oncogène, EWS/Fli-1 est toxique dans de nombreux types cellulaires [25-27], et y induit la mort cellulaire à moins d'être associé à une altération de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 ou p16 [26-27].



Figure 1 : Transformation tumorale des cellules NIH/3T3 après expression de EWS/Fli-1 (données personnelles Dr. JR Bertrand, UMR8203)

L'inhibition de EWS/Fli-1 dans des lignées cellulaires humaines induit une inhibition de la croissance cellulaire, ce qui laisse penser que EWS/Fli-1 est impliqué dans le développement du sarcome d'Ewing. De plus, EWS/Fli-1 induit le phénotype particulier des cellules du sarcome d'Ewing, qui se présente sous forme de petites cellules rondes (figure2).

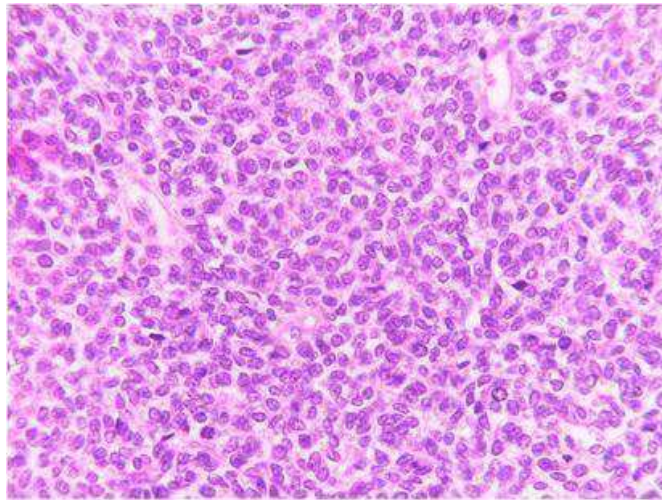


Figure 2 : Coupe histologique d'une tumeur d'Ewing [28].

Les protéines TET (FUS, EWS, TAF15, CAZ, EWSR1A et EWSR1B) sont exprimées de manière ubiquitaires, principalement au niveau nucléaire et présentent une structure similaire [29]. De plus, FUS et TAF15 sont impliquées dans des translocations avec les mêmes partenaires que EWS [22]. Identifiée en 1992 [24], la protéine EWS est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme l'expression des gènes, la signalisation cellulaire et le transport des ARN. Son ARN messager est exprimé de manière ubiquitaire et homogène (entre différents tissus et entre les différentes phases du cycle cellulaire).

Fusion	Translocation	Pathologie associée	Références
EWS/Fli-1	t(11;22) (q24;q12)	ESFT	[7, 20-21]
EWS/ERG	t(21;22) (q22;q12)	ESFT	[30]
EWS/ETV1	t(7;22) (p22;q12)	ESFT	[31]
EWS/E1A-F EWS/ETV4	t(17;22)(q12;q12)	ESFT	[32-33]
EWS/FEV	t(2;21;22)(q33;q22;	ESFT	[34]
EWS/ZSG	t(1;22) (p36.1;q12)	ESFT	[35]
FUS/ERG	t(16;21) (p11;q22)	ESFT	[36]
EWS/SMARCA5	t(4;22) (q31;q12)	ESFT	[38]
EWS/SP3	t(2;22) (q31;q12)	ESFT	[39]
EWS/POU5F1	t(6;22) (p21;q12)	ESFT	[40]
EWS/WT1	t(11;22)(p13;q12)	Tumeur desmoplasique à petites cellules	[41]
EWS/CREB-1	t(2;22) (q33;q12)	Sarcome à cellules claires	[42]
EWS/ATF1	t(12;22)(q13;q12)	Sarcome à cellules claires	[43]
EWS/NR4A3 EWS/TEC	t(9;22)(q22;q12)	Chondrosarcome extrasquelettal myxoïde	[44]
EWS/CIZ1	t(12;22)(p13;q12)	Leucémie aigue	[45]
EWS/CHN1	t(9;22)(q22– 31;q11-12)	Chondrosarcome extrasquelettal myxoïde	[46]

Tableau 1 : Anomalies géniques impliquant EWS et un autre gène partenaire.

De plus il a une demi-vie longue. Ceci suggère qu'il pourrait s'agir d'un gène de ménage [47] (de même que FUS qui est aussi impliqué dans des réarrangements

chromosomiques de type FUS-ERG [22]). Composée de 656 acides aminés [48], elle contient un domaine N-terminal pour l'activation transcriptionnelle (impliqué dans EWS/Fli-1) et un domaine C-terminal pour la liaison à l'ARN. EWS est indispensable à la régulation des cellules souches. Son absence au sein des cellules induit la sénescence précoce dans des cellules souches hématopoïétiques [49].

Fli-1 a d'abord été identifié comme étant le site d'insertion du virus de la leucémie murine de Friend (Friend leukemia virus) [50]. Fli-1 est composé par des domaines ETS en 5' et en 3' séparés par un domaine spécifique Fli-1 (FLS) [51]. La partie 3' ETS qui contient le domaine de liaison à l'ADN est celle qui participe à la fusion EWS/Fli-1. A l'âge adulte on le retrouve dans les cellules hématopoïétiques principalement mais aussi à un faible niveau dans le cœur, les poumons et les ovaires [52]. Fli-1 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales et dans les cellules du mésenchyme dérivées de la crête neurale pendant le développement [53]. Fli-1 semble jouer un rôle important dans la vasculogénèse ainsi que dans l'hématopoïèse [54-55]. Fli-1 régule la protéine rétinoblastome (Rb) au niveau transcriptionnel, ce qui permet le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire [56]. L'activation de Fli-1 dans les cellules de la lignée érythrocytaire induit bcl-2 et l'augmentation de la survie cellulaire [57].

1.2.3. Marqueur cd99/mic2

La protéine de membrane cd99 est le produit du gène MIC-2 [58], gène pseudo autosomal situé sur le bras court des chromosomes X et Y [59]. Il s'agit d'une glycoprotéine de 32kDa [58] peu exprimée dans la plupart des lignées cellulaires humaines non cancéreuses ainsi que dans la majorité des tumeurs n'appartenant pas au groupe des ESFT [60-61]. Il a cependant été prouvé que cd99 était exprimé

dans les lymphomes [62-63] et dans certaines tumeurs solides au niveau cytoplasmique [64-66]. Cet antigène est impliqué dans les processus d'adhésion cellulaire des lymphocytes T [61]. Cd99 est surexprimé dans les sarcomes d'Ewing et plus généralement dans les ESFT [61, 67] dans 85 à 95% des cas [60, 68] (figure 3).

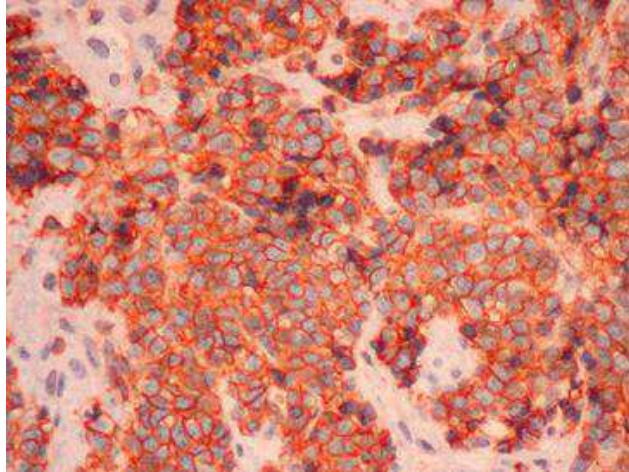


Figure 3: Coupe de sarcome d'Ewing présentant un marquage CD99 positif (source: http://www.pedsoncologyeducation.com/ewing_pathology.asp).

Par contre, Cd99 n'est pas ou très rarement exprimé dans les tumeurs présentant une localisation similaire tels que le chondrosarcome, l'ostéosarcome à petites cellules et les sarcomes osseux non Ewing [60].

Cd99 est fortement exprimé dans les thymocytes immatures corticaux et joue un rôle dans leur maturation [69]. Dans les cellules immunitaires, Cd99 est impliqué dans l'agrégation homotypique, l'apoptose [70-71], la migration des lymphocytes T [72] et des monocytes [73], l'activation des MAP kinases [74], le transport des molécules MHC de classe 1 depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane [75] et l'adhésion cellulaire [76].

Dans le sarcome d'Ewing, il joue un rôle dans la différenciation des cellules neuroectodermes primitives [77], l'apoptose [78]. De plus, dans le sarcome d'Ewing, la surexpression de cd99 semble contribuer à la croissance et à la migration

tumorale à travers l'inhibition de KCMF1, un facteur de modulation des canaux potassiques [79].

1.3. - Diagnostic du sarcome d'Ewing

Le diagnostic des ESFT repose sur plusieurs aspects tels que l'utilisation des outils de biologie moléculaire, l'histopathologie et l'imagerie médicale.

Concernant l'aspect clinique le sarcome d'Ewing peut se manifester par l'apparition de douleurs osseuses, tuméfactions et gonflement au niveau de la tumeur.

L'imagerie est le premier outil de diagnostic utilisé, principalement la radiologie classique complétée par la tomographie (CT-Scan) ou l'imagerie de résonnance magnétique (IRM). A la suite de l'examen radiologique une biopsie tumorale est habituellement réalisée pour un diagnostic moléculaire et histologique.

Le diagnostic moléculaire repose principalement sur la détection du transcrit d'EWS/Fli-1 par RT-PCR ainsi que sur l'utilisation de la technique d'hybridation fluorescente in-situ (FISH) pour détecter la présence de la fusion EWS/Fli-1. La RT-PCR présente l'avantage de pouvoir être utilisée pour détecter les cellules tumorales circulantes et donc prédire le risque d'apparition de métastases [80]. L'hybridation fluorescente *in-situ* ne permet pas de détecter les translocations les plus rares donc des cas de faux négatifs sont possibles.

Au niveau histologique, le principal critère de diagnostic est la morphologie des cellules tumorales, les ESFT étant constitués de petites cellules rondes (figure 2). On considère également comme critère de diagnostic la positivité au marqueur Mic2 associé à la négativité à la desmine.

Après établissement du diagnostic un bilan pré-thérapeutique est réalisé qui inclut la recherche de métastases osseuses (scintigraphie), pulmonaires (radiologie du thorax) et médullaires (biopsie et myélogramme).

1.4. - Stratégies thérapeutiques standards

Avant les années 1970, le traitement du sarcome d'Ewing était basé sur la chirurgie (amputations) associées aux irradiations, avec une survie sans récurrence inférieure à 20%. Le sarcome d'Ewing a été décrit dans les années soixante comme étant sensible aux chimiothérapies telles que la vincristine, la daunomycine, le cyclophosphamide et l'actinomycine D ce qui a ouvert la voie à l'utilisation de traitements chimiothérapeutiques et donc à l'amélioration de la survie des patients [81-84] puis à l'instauration de protocoles associant plusieurs molécules tels que nous les connaissons aujourd'hui. Dans les années 90 sont apparus des protocoles associant plusieurs molécules comme l'étoposide et l'ifosfamide [85]. Des études épidémiologiques montrent que la survie des patients a été améliorée entre les années 70 et les années 90, ce qui correspond à l'arrivée des traitements basés sur les poly-chimiothérapies anticancéreuses. Ainsi la survie des patients ne présentant pas de métastases est passée de 44% à 68% entre 1973 et 1993 [5].

Les protocoles actuels ont été largement testés au cours d'essais cliniques multicentriques tels que Euro-Ewing (en cours) dont 19 ont été répertoriés depuis 1970 en Europe et aux Etats-Unis [1]. La figure 4 présente un exemple de protocole de traitement, utilisé dans l'essai Euro-Ewing pour le traitement des tumeurs localisées opérables.

1.5. - Avancées thérapeutiques récentes et essais cliniques en cours

1.5.1. Antiangiogéniques

Des facteurs angiogéniques, dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), sont connus pour leur importance dans l'angiogénèse tumorale, notamment en induisant la prolifération et le chimiotactisme des cellules endothéliales [91]. Cela a été également démontré dans le cas du sarcome d'Ewing [92]. Les lignées ESFT A673, RDES, SKES1, SK-N-MC, TC32, TTC-32, TTC-466 [93] et TC71 [94] sont productrices de VEGF. Des taux de VEGF élevés sont retrouvés chez les patients atteints du sarcome d'Ewing comparé aux individus sains et diminuent lors de la régression tumorale [95-96]. De plus, Fuchs *et al.* ont montré que EWS/Fli-1 était un facteur de transcription pour le VEGF [97] et la transfection de EWS/Fli-1 dans des cellules d'ostéosarcome induit l'expression du VEGF-A [98].

Plusieurs stratégies antiangiogéniques ont été répertoriées pour le traitement du sarcome d'Ewing au niveau préclinique et clinique. Les études reportées concernent en majorité l'utilisation d'inhibiteurs du VEGF.

L'inhibition de EWS/Fli-1 par un siRNA dans la lignée A673 inhibe la sécrétion de VEGF-A de 98% *in vitro*. *In vivo*, ce siRNA associé à l'atélocollagène induit une inhibition de la croissance tumorale ainsi que de la densité de microvaisseaux observés dans les tumeurs [98].

Dans la lignée TC71, l'utilisation d'un siRNA anti-VEGF165 diminue de 98% la production de la protéine correspondante [99]. Dalal *et al.* ont également démontré l'utilité des thérapies anti-VEGF dans le cas du sarcome d'Ewing. Le bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche), un anticorps monoclonal qui bloque le VEGF, entraîne un retard de croissance des tumeurs traitées (10 mg/kg, 2 fois par semaine) de

même qu'un autre anticorps, le VEGF Trap (Aflibercept, Regeneron) (2,5 or 25 mg/kg 2 fois par semaine) [93].

Le cediranib (Recentin, AZD2171, AstraZeneca) est un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique des récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF-R). Le cediranib peut être administré par voie orale une fois par jour et a une demi vie de 20 heures [100]. Dans le cas du glioblastome, le cediranib permet une normalisation des vaisseaux tumoraux chez les patients traités [100]. Le cediranib a montré une efficacité anti tumorale *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs types de tumeurs solides dont le sarcome d'Ewing [101].

Le sunitinib (SU11248, Sutent, Pfizer) est également un inhibiteur des récepteurs du VEGF mais aussi du PDGF, de FLT3 et KIT. Le sunitinib bénéficie actuellement d'une AMM dans les cas de cancer du rein avancé ou métastatique et dans les tumeurs stromales digestives. *In vitro* son action est limitée aux cellules leucémiques. *In vivo* chez la souris, le sunitinib a montré une efficacité intermédiaire à élevée dans 80% des xénogreffes de sarcome d'Ewing traitées. Cependant à l'arrêt du traitement la croissance tumorale a repris dans tous les types de tumeurs traitées avec succès à l'exception d'une tumeur rhabdoïde [102].

1.5.2. Petites molécules inhibitrices de kinases

Depuis le succès médical et commercial de l'imatinib (Glivec, Novartis) dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, les inhibiteurs de tyrosine kinases sont extensivement étudiés pour le traitement des cancers. Naturellement certains d'entre eux ont également été évalués dans le cas des ESFT.

L'imatinib tout d'abord a été évalué dans le cadre du traitement du sarcome d'Ewing. L'imatinib a permis, *in vitro* d'induire l'apoptose dans toutes les lignées cellulaires

testées et *in vivo*, d'inhiber ou de stabiliser la croissance tumorale (50-100mg/kg). Ceci montre que les thérapies ciblées vers les kinases pourraient être d'un grand intérêt dans le sarcome d'Ewing, d'autant plus que l'imatinib et d'autres molécules de la même classe thérapeutique disposent déjà d'une AMM, s'administrent facilement par voie orale et sont connues au niveau de leur pharmacologie et de leur toxicité.

Le dasatinib aurait un possible rôle dans la prévention de l'apparition des métastases dans le sarcome d'Ewing. En effet, il a été montré qu'il a un effet cytostatique et anti-migratoire *in vitro*. Cependant, aucun effet sur l'apoptose n'a pu être mis en évidence ce qui suggère qu'il ne pourra être utilisé qu'en association avec d'autres agents de chimiothérapie [103].

L'ABT-869 est un inhibiteur de kinase qui cible différentes kinases, Fms-like tyrosine kinase-3, c-kit, le VEGF-R et PDGFR. ABT-869 inhibe la prolifération des lignées A673 et TC71 *in vitro*. *In vivo*, une inhibition de la croissance tumorale et une augmentation de la survie des animaux ont pu être observées [104].

Les inhibiteurs de tyrosine kinase SU6668 et SU5416 retardent également la croissance tumorale dans le sarcome d'Ewing [93].

1.5.3. Inhibiteurs d'IGF-1

La voie de l'IGF-1R joue un rôle important dans le développement tissulaire et la croissance, ainsi que dans l'action de l'insuline. Le récepteur IGF-1R est un récepteur tyrosine kinase transmembranaire activé par l'Insulin Growth Factor like-1 (IGF-1) et 2 (IGF-2). Il est composé de deux sous unités alpha et de deux sous-unités bêta reliées par des ponts disulfure. IGF-1R active des voies anti-apoptotiques, la prolifération cellulaire ainsi que la différenciation. De plus, durant la période de croissance, et particulièrement à l'adolescence, l'IGF-1R joue le rôle de

médiateur avec l'hormone de croissance. L'IGF est important dans les mécanismes de la croissance osseuse. Il contribue à 50% de la prolifération des cellules osseuses. Dans le sarcome d'Ewing, de nombreuses thérapies ciblant la voie de l'IGF-1 ont été étudiées. La figure 5 en présente un résumé.

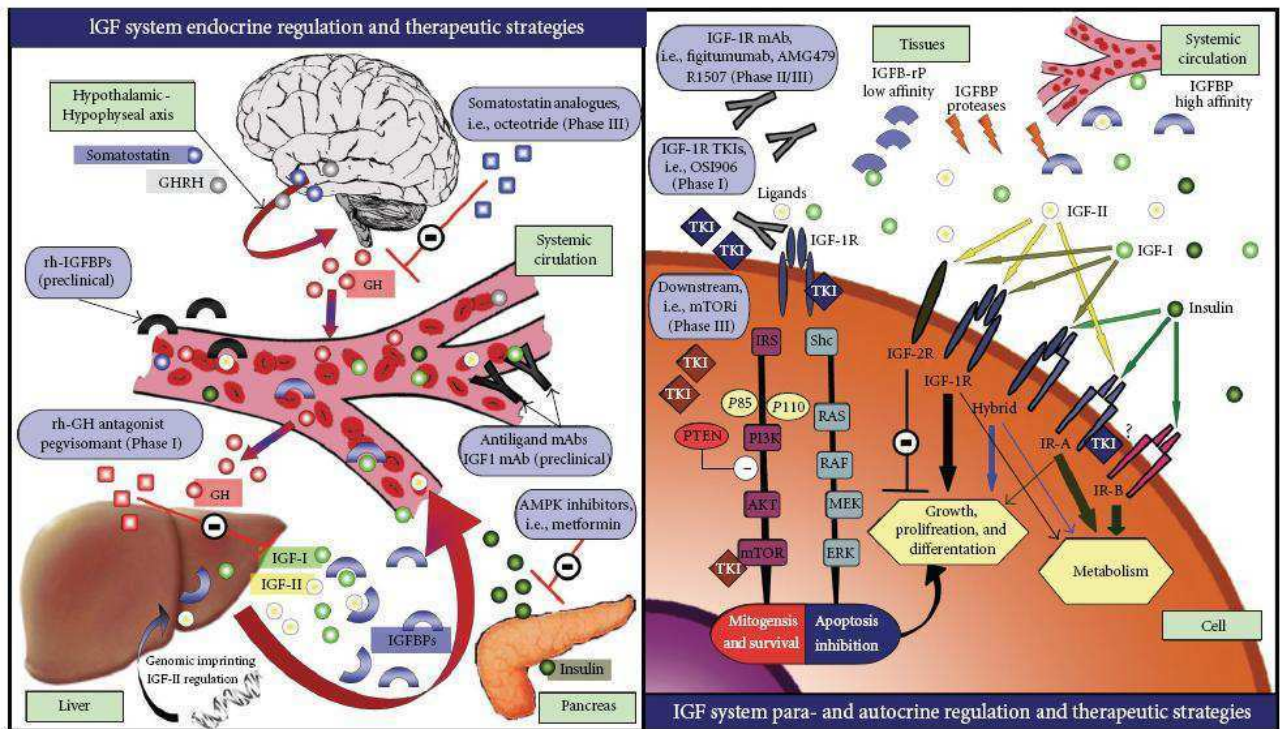


Figure 5 : Régulation endocrine (gauche) paracrine et autocrine (droite) de la voie de l'IGF et thérapies associées [105]

Un anticorps monoclonal anti IGF-1R a été développé pour le sarcome d'Ewing. *In vivo* le ganitumab (AMG 479) a été testé sur les cellules SK-ES-1 et a permis d'inhiber la croissance de xénogreffes. Le traitement a également permis la réduction de la phosphorylation d'IGF1R et d'Akt, ainsi que celle d'IGF1R détecté et l'activation de l'expression de la caspase-3.

Le NVP-ADW742 est une petite molécule ciblant l'IGF1-R qui induit l'inhibition de l'IGF1-R, AKT et mTOR, l'inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de

l'apoptose. Ces effets sont synergiques avec l'imatinib, la vincristine et la doxorubicine [106].

Le BMS-536924 est également un inhibiteur de l'IGF1-R. Il a été montré qu'il a une activité anti tumorale sur toutes les lignées de sarcome d'Ewing testées (TC32, LG, VW, TC71, RDES, Rh1, 5838, JD, KAG) avec des IC50 allant de 0,055 à 2,113 $\mu\text{mol/L}$ [107].

Le CP-751871 est un anticorps qui bloque l'IGF1-R et permet d'inhiber la croissance cellulaire (mais de manière limitée, inférieure à 50%) mais qui a un effet sur la voie de mTOR en induisant l'apoptose en combinaison avec la rapamycine. *In vivo*, le CP-751871 seul permet d'inhiber la croissance tumorale. En association avec la rapamycine, il induit des rémissions complètes chez la souris [108].

1.5.4. Inhibiteurs de m-TOR

mTOR (mamalian target of Rapamycin) est la cible de ce macrolide qui inhibe l'activité kinase de mTOR en se fixant à son récepteur. mTOR est un régulateur de la traduction et de la prolifération cellulaire. Il a été montré que les cellules du Sarcome d'Ewing exprimaient mTOR [109]. L'activation de mTOR a pu être retrouvée chez des patients souffrants de sarcome d'Ewing [110]. La rapamycine permet d'inhiber la croissance des cellules tumorales d'Ewing portant la translocation EWS/Fli-1 en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. L'inhibition de mTOR induit une diminution du taux de protéine EWS/Fli-1 présente dans les cellules [109].

Une étude de phase I de l'inhibiteur de mTOR temsirolimus (Torisel, Wyeth Pharmaceuticals) combiné au cixutumumab, un anticorps monoclonal qui inhibe l'IGF-1R (autorisé en France pour le traitement du carcinome rénal avancé) a été menée. La dose maximale tolérée dans cette étude a été de 6 mg/kg en intraveineux

pour le cixutumumab et 25mg en intraveineux pour le temsirolimus. Deux des trois patients souffrant de sarcome d'Ewing enrôlés dans cette étude ont bénéficié d'une réduction de leur tumeur [111]. Un autre essai clinique de phase I est actuellement en cours pour le temsirolimus associé au Doxil (Doxorubicine liposomale) selon le site internet <http://clinicaltrials.gov> (numéro d'identification NCT00949325).

1.5.5. Inhibiteurs spécifiques d'EWS/Fli-1

Des inhibiteurs spécifiques de la fusion EWS/Fli-1 et de ses transcrits ont été mis au point au cours des dernières années. Ces inhibiteurs présentent l'avantage de n'être actifs que sur les cellules porteuses de la mutation et donc, en théorie, permettraient d'éliminer le risque de survenue d'effets indésirables systémiques.

Les oligonucléotides antisens (ODN) sont de courts fragments d'ADN avec des séquences de base qui complètent une séquence d'ARNm. Ils peuvent s'hybrider à un ARNm cible et induire leur dégradation spécifique car les hybrides ARN/ADN sont des substrats de la ribonucléase H (RNase H). Par conséquent, ils inhibent la synthèse de la protéine correspondant à leur séquence d'ARNm complémentaire. *In vitro*, les ODN sont généralement délivrés dans les cellules après complexation avec les lipides cationiques. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, ils entrent librement dans le noyau. Il est généralement admis que leur interaction avec l'ARNm dans le noyau est responsable de leur activité, en effet la RNase H est essentiellement localisée dans le noyau [112]. Etant des acides nucléiques, les ODN sont des molécules fragiles à cause de leur squelette phosphodiester (sensible à l'action des nucléases). Ceci a conduit à la mise au point de modifications chimiques dont les plus connues sont les dérivés phosphorothioates et methyl phosphonates [113].

Les deux rapports initiaux par Tanaka *et al.* [114] et Toretsky *et al.* [115] utilisant des ODN datent de 1997. Ils traitent de plusieurs lignées cellulaires de sarcome d'Ewing *in vitro*, de cellules SKNMC *in vivo* [114] et de cellules TC32 *in vitro* [115]. Les deux publications traitent d'ODN ciblant une jonction *EWS/Fli-1* de type 1. Tanaka *et al.* ont utilisé des ODN de type phosphorothioates à une concentration de 10µM. Ces ODN ciblant la séquence de jonction se sont révélés efficaces pour inhiber la croissance de quatre lignées cellulaires du sarcome d'Ewing *in vitro* de manière dose-dépendante (1-30µM). Tanaka *et al.* ont également obtenu une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* à une dose totale de 1mM en injection intratumorale. Dans l'article de Toretsky *et al.* les ODN sont de type phosphodiester protégés en 3' et 5' par un groupement thioate. L'électroporation a été utilisée pour les faire pénétrer dans les cellules. Plusieurs ODN ciblant la jonction ont été étudiés et l'un d'entre eux, ciblant la jonction de type 1, a permis de réduire la concentration de la protéine *EWS/Fli-1* dans les cellules. Cependant la protéine *EWS* exprimée par le chromosome 22 non transloqué a aussi été inhibée. Une inhibition de croissance cellulaire a été observée, que les auteurs attribuent à l'inhibition de *EWS/Fli-1* car l'inhibition de *EWS* par le même ODN dans des cellules PC-3M ne présentant pas de fusion n'a pas induit d'inhibition de croissance cellulaire. Il a été confirmé par ailleurs que l'inhibition de *EWS* par des ODN n'a pas été létale pour des cellules HeLa [116]. Cependant ces résultats doivent être interprétés avec précaution car la fonction cellulaire de *EWS* n'est pas connue. De plus, il a été rapporté que les protéines *EWS/Fli-1* et *EWS* peuvent former des hétérodimères [117]. L'inhibition concomitante d'*EWS/Fli-1* et d'*EWS* peut donc avoir un effet coopératif concernant l'action de *EWS/Fli-1*. Cependant, si on considère le modèle des cellules NIH/3T3 exprimant *EWS/Fli-1*, l'inhibition de *EWS* n'est pas souhaitable [118].

L'oligonucléotide phosphorothioate de 25 bases décrit par Tanaka *et al.* [114] a aussi été utilisé *in vivo* par Lambert *et al.* [119] en utilisant des xénogreffes de souris obtenues à partir de cellules NIH/3T3 transformées par EWS/Fli-1. Cet ODN cible la fusion de type 1 tout en s'hybridant de façon plus forte à la partie Fli-1 de EWS/Fli-1. Lambert *et al.* l'ont encapsulé dans des nanocapsules polymères qu'ils ont injectées directement dans les tumeurs exprimant EWS/Fli-1. Ils ont observé une inhibition de 70% de la croissance tumorale à la dose de 5 mg/kg avec l'ODN et aucune inhibition avec l'oligonucléotide contrôle ou avec l'ODN EWS/Fli-1 libre. Avec le même modèle tumoral Maksimenko *et al.* ont utilisé un ODN de 30 bases également dirigé contre la jonction de type 1. Cet ODN a une affinité plus forte pour *EWS* que pour *Fli-1*. L'examen de la séquence montre qu'il doit avoir une structure secondaire en tige boucle, la tige étant constituée de 22 nucléotides phosphodiester (comprenant 5 nucléotides non complémentaires de la cible mais servant à la stabilisation de la cible et à sa protection contre la dégradation) et d'une boucle de 8 nucléotides phosphorothioates pour le protéger de l'attaque par les nucléases simple brin [120]. Il a été montré que cet ODN agit bien comme un antisens, inhibant EWS/Fli-1 de 50 % après ajout en présence de lipides cationiques à des cellules NIH 3T3 exprimant de façon stable EWS/Fli-1 [121]. L'inhibition de l'ARNm de *EWS* est alors de l'ordre de 10% (A. Maksimenko, communication personnelle). Après association à des nanosphères polymères recouvertes d'un composé cationique le cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB), cet oligonucléotide inhibe aussi la croissance tumorale après administration intra-tumorale. A la même dose d'oligonucléotide (5 mg/kg) l'inhibition obtenue est légèrement meilleure que celle obtenue en utilisant le 25 mer phosphorothioate encapsulé [122]. Ce résultat est intéressant car il signifie que quoique l'utilisation *in vivo* du vecteur polymère soit

requis, l'effet obtenu est similaire bien que l'oligonucléotide et le système de vectorisation soient différents. Il semble donc qu'il y ait une sensibilité intrinsèque à l'action *in vivo* des oligonucléotides ciblés contre *EWS/Fli-1* dans ce modèle murin. L'ODN tige-boucle associé aux nanosphères polymère n'inhibe pas spécifiquement la croissance cellulaire en culture [121]; cependant, il inhibe l'expression de *EWS/Fli-1* en culture cellulaire de manière spécifique (A. Maksimenko, communication personnelle). Il semble donc que l'inhibition de *EWS/Fli-1* soit un élément déterminant pour obtenir un effet anti-tumoral par administration intratumorale. Par la suite ces ODN fixés sur des nanoparticules ont été montrés comme actifs par voie intraveineuse [121]. Elhamess *et al.* ont notamment montré que la délivrance d'un oligonucléotide antisens par des nanoparticules de Poly(IsoHexylCyanoAcrylate)-Chitosane (PIHCA/Chitosane) par voie systémique permettait d'inhiber la croissance tumorale chez la souris de manière spécifique (l'inhibition commence à 30mg/kg et atteint 70% à 120mg/kg) [123].

1.5.6. Anticorps anti-Cd99

En plus de son utilisation en tant que facteur de diagnostic, cd99 a aussi été utilisé pour traiter le sarcome d'Ewing. En effet, cd99 est impliqué dans l'adhésion cellulaire et l'apoptose. L'utilisation d'un anticorps monoclonal activant cd99 induit l'apoptose caspase dépendante *in vitro* et *in vivo* [78, 124]. En association avec la doxorubicine, on observe une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* ainsi qu'une inhibition des métastases osseuses [125].

1.5.7. Autres avancées thérapeutiques

De nombreuses autres thérapies sont à l'essai pour le traitement du sarcome d'Ewing. Parmi elles on peut citer :

- le Fenretinide, un dérivé de l'acide rétinoïque qui induit l'apoptose et la mort cellulaire *in vitro* et réduit la croissance tumorale *in vivo* [126-127].
- YK-4-279, est une petite molécule qui bloque la liaison de la RNA hélicase A sur EWS/Fli-1, induit l'apoptose dans les cellules d'ESFT et réduit la croissance tumorale *in vivo* [128]. La RNA hélicase A est surexprimée dans les lignées cellulaires d'ESFT et stimule l'activité transcriptionnelle de EWS/Fli-1 [129].
- les bisphosphonates, tels que l'acide zolédronique, sont des molécules principalement utilisées pour le traitement de l'ostéoporose, de l'hypercalcémie et des métastases osseuses. Ils permettent d'inhiber la résorption osseuse. C'est un principe actif très connu et présentant peu d'effets secondaires graves. Chez l'homme l'utilisation de l'acide zolédronique associée à la chimiothérapie (temozolomide et irinotecan) a fait l'objet d'au moins un rapport dans le cas du sarcome d'Ewing métastatique, montrant une réponse très importante avec une diminution du nombre de métastases dans l'ensemble des tissus touchés [130]. Zhou *et al.* ont montré que l'acide zolédronique permettait d'induire l'apoptose dans les cellules TC71 et d'inhiber la croissance cellulaire. L'utilisation de l'acide zolédronique sur des tumeurs intra tibiales primaires du sarcome d'Ewing a permis d'inhiber l'apparition de la tumeur dans 66% des cas contre 22% pour le paclitaxel et 78% avec un traitement associant le paclitaxel et l'acide zolédronique [131].
- le Bortézomib, un inhibiteur du protéasome a également été testé dans le sarcome d'Ewing et a permis d'induire l'apoptose ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire [132].

2. - L'ARN interférence

2.1. – Découverte

Les petits ARN interférents (siRNA pour small interfering RNA en anglais) sont de courts ARN double brin de 21-23 nucléotides qui sont capables de s'hybrider spécifiquement avec un ARNm complémentaire et peuvent provoquer sa dégradation spécifique [133].

Leur découverte a succédé à une observation inattendue rapportée en 1990 Napoli *et al.* Alors que cette équipe de chercheurs tentaient de renforcer la coloration de pétunias, ils ont obtenu l'effet contraire, observant une inhibition de la coloration. Pour réaliser cette expérience, ils ont ajouté l'ADN du gène de la Chalcone Synthase, qui donne leur coloration aux pétales des fleurs. Contre toute attente, 42% des fleurs présentaient un défaut de coloration (9% dans les témoins). L'adjonction de copies supplémentaires du gène permettait donc d'inhiber son expression. Ce phénomène a été appelé Post-Traductionnal Gene Silencing (PTGS) [134].

Identifiés en 1998 par Fire *et al.* chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, de longs ARN double brins ont permis d'abolir l'expression de gènes ayant une homologie de séquence avec l'ARN introduit. L'introduction d'ARN double brin dans les cellules induit une diminution importante ou une élimination du transcrit ARNm cible [135]. Des études similaires ont été conduites sur des embryons de mouches Drosophiles. L'injection d'ARN double brin dans des embryons de Drosophiles conduit à l'inhibition de certains gènes alors que les RNA simples brins n'ont qu'un faible effet. Kennerdell *et al.* ont utilisé cette technique pour déterminer la fonction de certains gènes tels que frizzled et Drosophila frizzled 2 [136].

Depuis leur découverte en 2001 chez les mammifères par Elbashir *et al.*[133], les siARN ont été largement étudiés comme étant potentiellement de nouveaux outils thérapeutiques dans la lutte contre de nombreuses maladies telles que le HIV, la maladie de Huntington, l'hypercholestérolémie, les cancers ainsi que l'étude de la fonction de nombreuses protéines.

2.2. – Mécanisme

Habituellement les siRNA les plus efficaces sont composés d'un brin sens formé de 21-nucléotide et d'un brin antisens également formé de 21-nucléotides, présentant deux nucléotides libres à leurs extrémités 3' [137].

Le mécanisme d'action des siRNA est indiqué en figure 6.

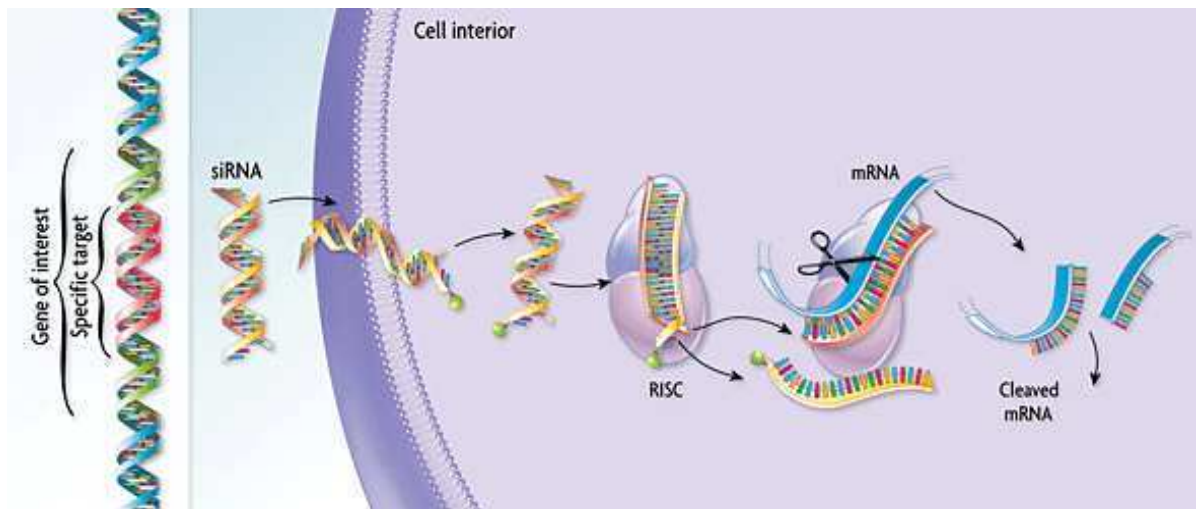


Figure 6 : Mécanisme d'action des siRNA. RISC : REducing-inducing silencing complex. mRNA: ARN messenger (source: http://www.alnylam.com/rnai_primer/rna-interference-pg5.htm)

Selon les connaissances actuelles, des ARN double brin endogènes de grande taille sont coupés en petits morceaux, appelés siRNA, par le Dicer qui est une RNase III [138]. Puis, un complexe protéique appelé le RNA-Induced Silencing Complex

(RISC) s'associe avec le siRNA. Ce complexe élimine l'un des deux brins de siRNA et interagit avec un ARN cible grâce à la complémentarité de la séquence proposée par le fragment conservé d'ARN (brin guide utilisé pour guider le complexe RISC).

Une fois le complexe spécifiquement hybridé à l'ARNm cible, l'endonucléase Argonaute 2 (Ago2), qui est associée avec le complexe RISC, clive l'ARNm. Les ARN ainsi clivés siRNA seront dégradés par des exonucléases cytoplasmique.

Le complexe RISC peut être impliqué dans plusieurs séries de clivage d'ARNm. Cette dernière propriété permet une plus grande efficacité de l'extinction du gène [139].

2.3. Effets secondaires des siRNA

Malgré le haut potentiel des siRNA en tant que nouvel outil thérapeutique et leur sélectivité pour leur cible (un changement d'une base dans la séquence du siRNA pouvant le rendre inactif [137, 140]) il a été démontré que les siRNA pouvaient avoir des effets non spécifiques. Ces effets peuvent être des effets off-target, l'induction d'une réponse immunitaire ou des effets miRNA-like. Des solutions pour diminuer ces effets off-target sont de diminuer la concentration en siRNA utilisée ou de modifier chimiquement le squelette des siRNA.

2.3.1. Effets off-Target

L'existence d'effets off-target liés à l'utilisation de siRNA a été montrée pour la première fois en 2003 par Jackson *et al.* [141]. En utilisant des puces après transfection avec des siRNA, Jackson *et al.* ont montré que l'expression de nombreux gènes pouvait être modifiée. De plus les auteurs ont montré qu'à la fois le

brin sens et le brin antisens pouvaient contribuer à l'activité observée. Ces effets off-targets peuvent avoir des effets importants sur les cellules. Lin *et al.* ont montré qu'il était possible d'éteindre un gène (HIF-1) grâce à un effet off-target des siRNA basé sur la reconnaissance de 7 nucléotides [142].

2.3.2. Immunostimulation

Elbashir *et al.* ont initialement montré que les fragments de taille inférieure à 30bp, comme les siRNA qui font 21-23 pb, n'entraînaient pas de réponse interféron [133]. Cependant les cellules immunitaires humaines expriment des Toll-Like récepteurs (TLR). Les types 7 et 8 peuvent reconnaître les siRNA de manière séquence dépendante. Les TLR7 sont impliqués dans la production de cytokines après activation par des siRNA dans les cellules immunitaires chez la souris, dont une augmentation de la production d'interféron [143-144]. Les séquences de siRNA, indépendamment de leur richesse en guanines et en uraciles peuvent stimuler la production d'interféron *in vitro* et *in vivo* [143]. Les TLR de type 3 peuvent quand à eux, reconnaître les siRNA de manière séquence indépendante et induire la production d'interféron, de protéines kinases qui bloquent la synthèse protéique ainsi que de RNase qui dégrade les ARN messagers (figure 7) [145-146].

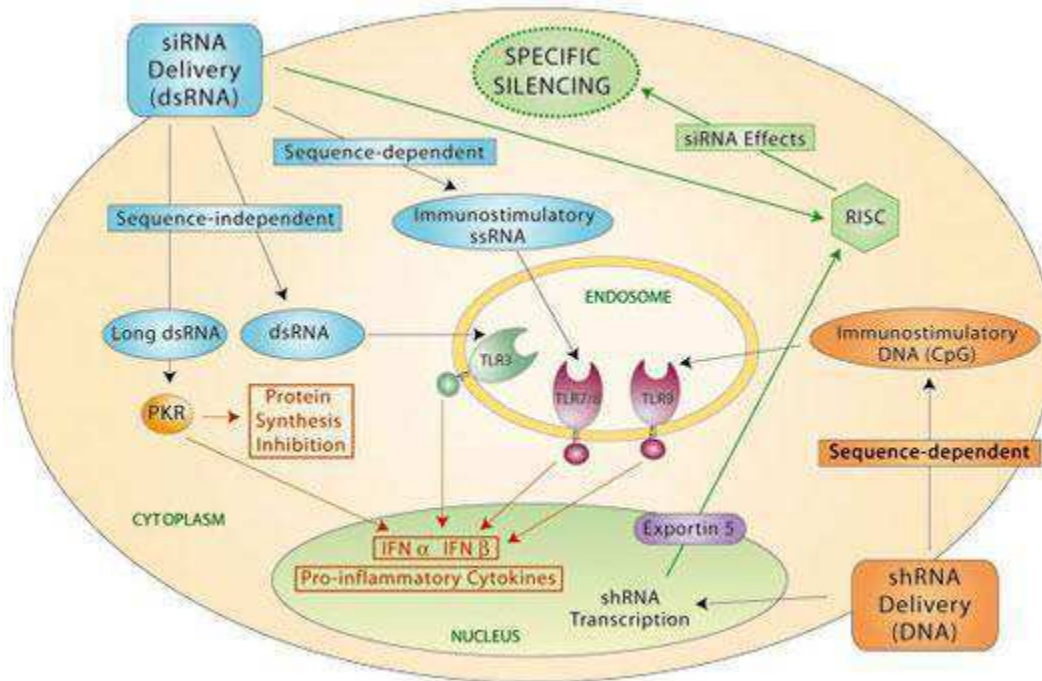


Figure 7 : Effets immunitaires des siRNA (<http://www.invivogen.com/review-rna-interference-ifn-response>).

Connaitre ces possibles effets immunostimulateurs des siRNA est important dans leur utilisation en tant que thérapies. En effet, ces effets immunitaires peuvent entraîner une toxicité chez la souris comme par exemple une diminution des taux de cellules sanguines et de plaquettes [144]. Cependant ces effets peuvent être aussi utilisés à dessein afin d'augmenter la réponse anti-tumorale en utilisant le système immunitaire

2.4. Applications au sarcome d'Ewing

2.4.1. Culture cellulaire

Il est possible de cibler la jonction EWS/Fli-1 au niveau du messenger dans le cas du Sarcome d'Ewing. La figure 8 récapitule les principales séquences de nucléotides utilisées dans l'inhibition de EWS/Fli-1.

Dans trois lignées différentes de sarcome d'Ewing (STA-ET-7.2, SK-N-MC et TC52), Siligan *et al.* ont utilisé des short hairpin RNA (shRNA) (petits ARN doubles brins en forme d'épingle à cheveux permettant d'exprimer des siRNA), l'un ciblant la jonction de type 1, un autre celle de type 2 et un troisième la partie *Fli-1* de la jonction. Ces shRNA transcrits par la RNA polymérase III inclus dans un vecteur rétroviral permettent de détruire l'ARN messenger correspondant. Les auteurs ont également montré une inhibition de la croissance cellulaire [147].

Dans les cellules TC35, Dohjima *et al.* ont induit la production de siRNA à partir de deux shRNA dirigés contre la jonction de type 1. L'un des deux siRNA a aussi permis l'inhibition partielle de Fli-1. L'ARN messenger a été dégradé à 80% et la réduction de la croissance cellulaire observée a été de 50 à 60% [148].

Dans les cellules SK-ES, Chansky *et al.* ont utilisé un siRNA dirigé contre la jonction de type 2 mais sans efficacité. Par contre, un siRNA anti Fli-1 introduit dans les cellules par électroporation a permis d'inhiber EWS/Fli-1. La protéine Fli-1 n'est pas exprimée dans les cellules SK-ES-1. Dans les cellules SK-ES, cette inhibition a augmenté l'apoptose et a diminué l'invasivité [149].

POINT DE JONCTION	
EWS	FLI-1
5'-UCAAUUAAGCCCAACAGAGCAGCAGCUACGGGCAGCAGAACCCUUCUUAUGACUCAGUCAGAAGAGCAG-3'	(1)
3'-CGTCGATGCCCGTCGTCTTGGGAAG-5'	(2)
3'-CGTCTTGGGAAGAATACTGAGTCAG-5'	(3)
3'-TCGTCTTGGGAAGAATACTG-5'	(4)
3'-GTCGATGCCCGTCGTCTTGGGAAG-5'	(5)
3'-TCGTCTTGGGAAGA-5'	(6)
3'-ATGCCCGTCGTCTTGGGAAGAATAC-5'	(7)
3'-CCGUCGUCUUGGGAAGAAUAC-5'	(8)
3'-UCGAUGCCCGUCGUCUUGGGA-5'	(9)
3'-UCGUCUUGGGAAGAAUACU-5'	(10)
3'-GUCGAUGCCCGUCGUCUUGGG-5'	(11)
3'-CGUCUUGGGAAGAAUACUG-5'	(12)

Figure 8 : Séquences de siRNA et d'ODN dirigées contre EWS/Fli-1 utilisées dans la littérature (d'après Maksimenko *et al.* [150])

(1): Point de jonction de l'ARNm de EWS/Fli-1.

(2): Maksimenko *et al.*, [120]

(3): Tanaka *et al.*, [114] ; Lambert *et al.*, [119]

(4)(5)(6): Toretsky *et al.*, [115]

(7): Tanaka *et al.*, [114]

(8): Prieur *et al.*, [151]

(9)(10): Dohijima *et al.*, [148]

(11): Toub *et al.*, [152]

(12) Siligan *et al.* [147]

Prieur *et al.* ont utilisé un siRNA ciblant la jonction de type 1 dont la cible se situe entre celles utilisées par Dohijima *et al.* [148] (figure 8). Après transfection avec l'oligofectamine dans les cellules A673, une analyse microarray a permis d'identifier des gènes sous la dépendance de EWS/Fli-1. Après deux transfection, les auteurs ont montré un arrêt total de la croissance cellulaire des cellules A673 et une augmentation de l'apoptose [151].

Comme les protocoles de traitement des cellules avec des siRNA sont très variés, tirer des conclusions de celles-ci peut être délicat. De plus, l'existence d'effets off-target a été démontrée pour les siRNA, donc ces dernières peuvent avoir des effets bien plus larges que la séquence pour laquelle ils ont été mis au point. Les effets off-targets doivent être évalués pour chaque séquence utilisée et peu de publications existent pour le sarcome d'Ewing. Au niveau cellulaire, l'inhibition de EWS/Fli-1 peut avoir différents effets. Certains articles décrivent une induction de l'apoptose. Avec les ODN tout comme avec les siRNA on observe aussi fréquemment une inhibition de la croissance cellulaire, y compris avec l'utilisation de plasmides [153-154]. Cependant, les concentrations utilisées dans ces études sont très élevées et il a été montré que les produits de dégradation des oligonucléotides peuvent avoir des effets antiprolifératifs en agissant sur les pools intracellulaires de nucléotides [155]. Si on considère les cellules murines modifiées pour exprimer *EWS/Fli-1*, les 2 paramètres *in vitro* qui pourraient permettre de prédire de manière efficace l'effet anti-tumoral des siRNA pourraient être l'inhibition de EWS/Fli-1 et l'inhibition de croissance cellulaire [118].

Cependant, il s'agit de cellules murines dont on ne peut dire si les résultats observés seront transposables à l'homme. *In vitro*, il a été montré que les siRNA étaient plus efficaces pour inhiber un gène que les ODN et pouvaient être utilisés à une concentration inférieure [156]. Cependant, l'un comme l'autre ne permettent d'obtenir qu'une inhibition transitoire d'EWS/Fli-1. Par contre, il est envisageable d'utiliser les siRNA en association avec les chimiothérapies conventionnelles pour potentialiser leur effet thérapeutique et en prolonger l'effet. Dans ce sens, Yamamoto *et al.* ont montré une augmentation de l'effet anti-tumoral de l'actinomycine D dans des cellules du sarcome d'Ewing *in vitro* en inhibant EWS/Fli-1 par un siRNA [157].

En conclusion des siRNA ciblant l'ARNm de EWS/Fli-1 semblent avoir des effets intéressants *in vitro* et sont donc de bons candidats pour des tests *in vivo*.

2.4.2. Résultats *In vivo*

Hu-Lieskovan *et al.* ont utilisé contre *EWS/Fli-1* un siRNA condensé dans un polymère formant des nanoparticules couplées à la transferrine afin de cibler les tumeurs. L'injection de ces nanoparticules en intra veineux a permis de diminuer la croissance tumorale et métastatique chez la souris [158].

Dans notre laboratoire, Toub *et al.* ont utilisé un siRNA ciblant une jonction de type 1 encapsulé dans des nanocapsules de poly(alkylcyanoacrylate). L'injection intra tumorale de ces nanocapsules (1,1 mg/kg) chez la souris xénogreffée avec des cellules murines stablement transfectées avec EWS/Fli-1 a permis d'observer une inhibition de 80 % de la croissance tumorale [152].

1.1. - Essais cliniques en cours dans le domaine du cancer

Bien que de nombreux essais cliniques utilisant des siRNA soient en cours dans des pathologies aussi variées que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les troubles cardiovasculaires, les greffes rénales ou la dermatologie (Pachyonychia Congenita) seul un nombre restreint est actuellement en cours dans le traitement des cancers et aucun dans le traitement spécifique du sarcome d'Ewing (<http://clinicaltrials.gov/>).

Parmi les essais en cours pour le traitement des cancers on trouve :

- un essai de phase I visant à traiter les adénocarcinomes pancréatiques à l'aide du siG12D LODER (Silenseed Ltd). Il s'agit d'une matrice de polymère biodégradable à

libération prolongée (8 semaines) et ciblées (pancréas) transportant un siRNA dirigé contre la mutation G12D sur la protéine KRAS.

- un essai clinique de phase I pour traiter les tumeurs solides avec Atu027 (Silence Therapeutics). Atu027 est un siRNA liposomal ciblant la protéine kinase N3 (PKN3). *In vitro*, ce siRNA empêche la migration cellulaire. *In vivo*, Atu027 est efficace dans le traitement de tumeurs de la prostate et du pancréas. Il a été observé une réduction de la taille des tumeurs ainsi que de l'extension aux ganglions lymphatiques [159]. De plus Atu027 inhibe l'apparition de métastases pulmonaires dans différents modèles *in vivo* [160].

- un essai de phase I dans le traitement des tumeurs solides avec CALAA-01 (Calando Pharmaceuticals). CALAA-01 est un siRNA ciblant la sous-unité M2 de la ribonucléotide réductase (R2). Le CALAA-01 siRNA est protégé de la dégradation par les nucléases par des nanoparticules ciblées vers les cellules tumorales. Les nanoparticules (RONDEL) impliquées dans le complexe avec CALAA-01 sont composées de cyclodextrines, de polythéthylène glycol et de transferrine pour cibler les cellules tumorales [161].

-un essai clinique de phase I conduit par la société Alnylam. ALN-VSP02 est un siRNA dirigé contre le VEGF-A (angiogénèse) et la kinesine (prolifération) transporté par des nanoparticules lipidiques (LNP) (Temkira Pharmaceuticals). Cet essai concernait 28 patients (en novembre 2010) atteints de tumeurs variées dont une majorité de cancers colorectaux et présentant des lésions hépatiques. Pour le moment ALN-VSP02 est bien toléré par les patients et montre un effet anti-VEGF [162].

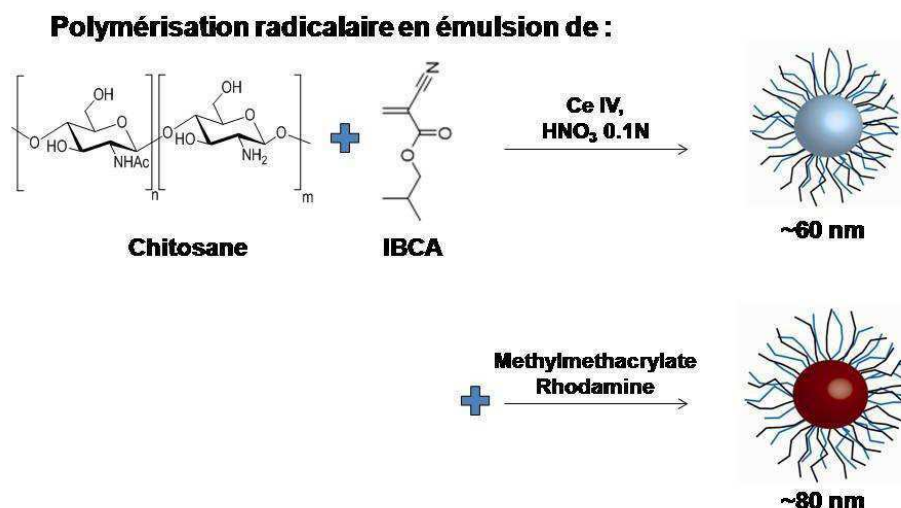
- deux essais cliniques de phase I conduits par Temkira Pharmaceuticals. Le premier, actuellement en cours, concerne leur siRNA TKM-PLK1, ciblant la protéine polo-like

kinase 1 (PLK1) impliquée dans la prolifération cellulaire et délivrée par des LNP. Cet essai concerne des patients souffrant de tumeurs solides et de lymphomes réfractaires aux thérapies standards. Le deuxième essai clinique, annoncé depuis août 2011, concernera des patients atteints de tumeurs hépatiques primaires ou de métastases hépatiques. Dans ce cas le TKM-PLK1 sera administré directement dans le foie par l'artère hépatique (source : <http://www.tekmirapharm.com>).

2. Conclusion

Le sarcome d'Ewing est un cancer pédiatrique complexe et dont le pronostic reste mauvais. Ceci d'autant plus que les métastases sont très agressives et apparaissent souvent avant le diagnostic initial. Les siRNA pourraient constituer une réponse spécifique et peu toxique au développement agressif du sarcome d'Ewing. La première partie de cette thèse a donc été consacrée à l'évaluation de différentes séquences de siRNA dirigés contre EWS/Fli-1. Cependant, les siRNA sont des molécules fragiles qui nécessitent l'utilisation de systèmes tels que les nanovecteurs pour assurer leur transport et leur efficacité *in vivo*. De nombreuses revues ont été publiées ces dernières années sur les nanoparticules polymériques utilisées pour la vectorisation d'acides nucléiques [163-169]. Cependant les études déjà réalisées utilisent des doses de siRNA importantes qui peuvent gréver les perspectives d'utilisation des siRNA au plan clinique. Le transport de ces molécules par des nanoparticules dirigées vers les cellules du sarcome d'Ewing permettrait d'une part de remédier à ce problème de dose et d'autre part d'atteindre les micrométastases dont le développement est responsable de la gravité de la maladie. La deuxième partie de ce travail de thèse a donc consisté à mettre au point des nanoparticules de

cyanoacrylate ciblées vers les cellules du sarcome d'Ewing. Les nanoparticules utilisées ont été des nanoparticules de poly(isobutylcyanoacrylate) précédemment étudiées dans notre laboratoire [170-171] et dont la synthèse est présentée en figure 9.



Et du pluronic F68 afin d'obtenir des nanoparticules de petite taille

Figure 9 : mode de synthèse et structure des nanoparticules synthétisées. IBCA :

IsoButylCyanoAcrylate

De très nombreux travaux ont déjà été réalisés sur ces nanoparticules qui ont démontré leur intérêt comme vecteur de principe actif [172-173]. Les différents ciblage envisageables avec des nanoparticules ont fait l'objet de revues [174-175]. Pour notre travail, nous avons choisi de cibler les nanoparticules de poly(isobutylcyanoacrylate) (PIBCA) en utilisant un système de couplage indirect basé sur la reconnaissance biotine/avidine. Ce système nous a permis de greffer à la surface des nanoparticules, des anticorps dirigés contre le marqueur membranaire cd99, dont l'expression est spécifique du sarcome d'Ewing. Le système de couplage ainsi que la stratégie utilisée sont présentés en figure 10 :

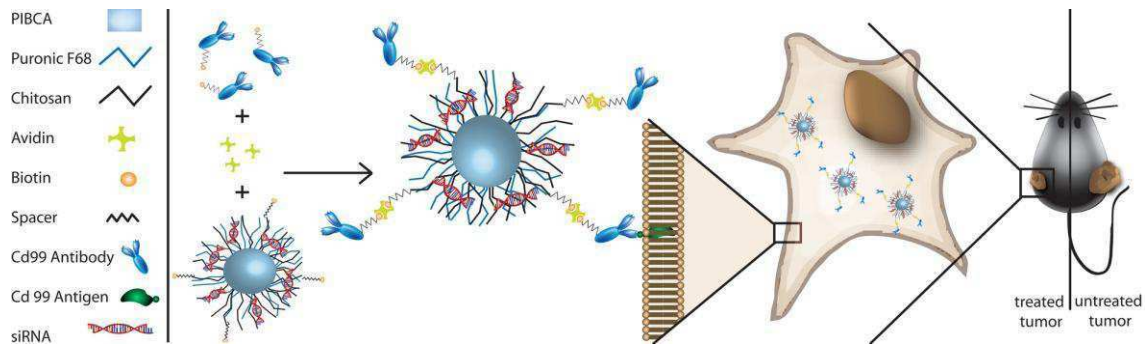


Figure 10 : Stratégie utilisée pour coupler les anticorps anti-cd99 aux nanoparticules de PIBCA/Chitosane et effets escomptés *in vitro* et *in vivo*.

Enfin, la dernière partie de cette thèse a été consacrée à l'utilisation de l'imagerie de fluorescence du petit animal (IVIS). Ce système a été utilisé pour mettre au point un modèle animal fluorescent de métastases du sarcome d'Ewing ainsi que pour détecter *in vivo* les nanoparticules au sein des tumeurs.

3. - Bibliographie:

1. Subbiah, V., *et al.*, *Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options*. Curr Treat Options Oncol, 2009. **10**(1-2): p. 126-40.
2. Tazi, I., *et al.*, [*Askin tumor: a case report with literature review*]. Cancer Radiother, 2009. **13**(8): p. 771-4.
3. Romeo, S. and A.P. Dei Tos, *Soft tissue tumors associated with EWSR1 translocation*. Virchows Arch, 2009. **456**(2): p. 219-34.
4. Delattre, O., [*Ewing's tumours, genetic and cellular aspects*]. Pathol Biol (Paris), 2008. **56**(5): p. 257-9.
5. Esiashvili, N., M. Goodman, and R.B. Marcus, Jr., *Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(6): p. 425-30.
6. Wasilewski-Masker, K., *et al.*, *Late recurrence in pediatric cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(24): p. 1709-20.
7. Aurias, A., *et al.*, *Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma*. N Engl J Med, 1983. **309**(8): p. 496-7.
8. Riggi, N., M.L. Suva, and I. Stamenkovic, *Ewing's sarcoma origin: from duel to duality*. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. **9**(8): p. 1025-30.
9. Miyagawa, Y., *et al.*, *Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(7): p. 2125-37.
10. Riggi, N., *et al.*, *EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells*. Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2176-85.
11. Riggi, N., *et al.*, *Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11459-68.
12. Castillero-Trejo, Y., *et al.*, *Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8698-705.
13. Cavazzana, A.O., *et al.*, *Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone*. Am J Pathol, 1987. **127**(3): p. 507-18.
14. Knezevich, S.R., *et al.*, *Absence of detectable EWS/FLI1 expression after therapy-induced neural differentiation in Ewing sarcoma*. Hum Pathol, 1998. **29**(3): p. 289-94.
15. von Levetzow, C., *et al.*, *Modeling initiation of ewing sarcoma in human neural crest cells*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19305.
16. Le Douarin, N.M., G.W. Calloni, and E. Dupin, *The stem cells of the neural crest*. Cell Cycle, 2008. **7**(8): p. 1013-9.
17. Takashima, Y., *et al.*, *Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1377-88.
18. Lee, G., *et al.*, *Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(12): p. 1468-75.

19. Hollenhorst, P.C., L.P. McIntosh, and B.J. Graves, *Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 437-71.
20. Turc-Carel C, et al., *Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma*. N Engl J Med, 1983. **309**(8): p. 497-8.
21. Turc-Carel, C., et al., *[Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]*. C R Seances Acad Sci III, 1983. **296**(23): p. 1101-3.
22. Riggi, N., et al., *Sarcomas: genetics, signalling, and cellular origins. Part 1: The fellowship of TET*. J Pathol, 2007. **213**(1): p. 4-20.
23. Uren, A. and J.A. Toretsky, *Ewing's sarcoma oncoprotein EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent*. Future Oncol, 2005. **1**(4): p. 521-8.
24. Delattre, O., et al., *Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours*. Nature, 1992. **359**(6391): p. 162-5.
25. May, W.A., et al., *Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5752-6.
26. Lessnick, S.L., C.S. Dacwag, and T.R. Golub, *The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts*. Cancer Cell, 2002. **1**(4): p. 393-401.
27. Deneen, B. and C.T. Denny, *Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation*. Oncogene, 2001. **20**(46): p. 6731-41.
28. Terrier-Lacombe, M.J., et al., *Superficial primitive Ewing's sarcoma: a clinicopathologic and molecular cytogenetic analysis of 14 cases*. Mod Pathol, 2009. **22**(1): p. 87-94.
29. Andersson, M.K., et al., *The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 37.
30. Sorensen, P.H., et al., *A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG*. Nat Genet, 1994. **6**(2): p. 146-51.
31. Jeon, I.S., et al., *A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1*. Oncogene, 1995. **10**(6): p. 1229-34.
32. Urano, F., et al., *A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **219**(2): p. 608-12.
33. Kaneko, Y., et al., *Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy*. Genes Chromosomes Cancer, 1996. **15**(2): p. 115-21.
34. Peter, M., et al., *A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors*. Oncogene, 1997. **14**(10): p. 1159-64.
35. Mastrangelo, T., et al., *A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor*. Oncogene, 2000. **19**(33): p. 3799-804.
36. Shing, D.C., et al., *FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4568-76.
37. Panagopoulos, I., et al., *Fusion of the FUS gene with ERG in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22)*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **11**(4): p. 256-62.

38. Sumegi, J., et al., *A novel t(4;22)(q31;q12) produces an EWSR1-SMARCA5 fusion in extraskeletal Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor*. Mod Pathol, 2011. **24**(3): p. 333-42.
39. Wang, L., et al., *Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions*. J Mol Diagn, 2007. **9**(4): p. 498-509.
40. Yamaguchi, S., et al., *EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12)*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **43**(2): p. 217-22.
41. Gerald, W.L., J. Rosai, and M. Ladanyi, *Characterization of the genomic breakpoint and chimeric transcripts in the EWS-WT1 gene fusion of desmoplastic small round cell tumor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(4): p. 1028-32.
42. Antonescu, C.R., et al., *EWSR1-CREB1 is the predominant gene fusion in angiomatoid fibrous histiocyoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2007. **46**(12): p. 1051-60.
43. Bosilevac, J.M., et al., *Tumor cell viability in clear cell sarcoma requires DNA binding activity of the EWS/ATF1 fusion protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34811-8.
44. Kumar, R., et al., *Spectrum of cytomorphological features, including literature review, of an extraskeletal myxoid chondrosarcoma with t(9;22)(q22;q12) (TEC/EWS) results in one case*. Diagn Cytopathol, 2008. **36**(12): p. 868-75.
45. Callen, D.F., et al., *New chromosomal rearrangement, t(12;22)(p13;q12), in acute nonlymphocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 1991. **51**(2): p. 255-8.
46. Sciort, R., et al., *t(9;22)(q22-31;q11-12) is a consistent marker of extraskeletal myxoid chondrosarcoma: evaluation of three cases*. Mod Pathol, 1995. **8**(7): p. 765-8.
47. Aman, P., et al., *Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS*. Genomics, 1996. **37**(1): p. 1-8.
48. Plougastel, B., et al., *Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation*. Genomics, 1993. **18**(3): p. 609-15.
49. Cho, J., et al., *Ewing sarcoma gene Ews regulates hematopoietic stem cell senescence*. Blood, 2010. **117**(4): p. 1156-66.
50. Athanasiou, M., et al., *FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells*. Leukemia, 2000. **14**(3): p. 439-45.
51. Rao, V.N., et al., *Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein*. Oncogene, 1993. **8**(8): p. 2167-73.
52. Ben-David, Y., et al., *Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1*. Genes Dev, 1991. **5**(6): p. 908-18.
53. Truong, A.H. and Y. Ben-David, *The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6482-9.
54. Spyropoulos, D.D., et al., *Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5643-52.

55. Brown, L.A., et al., *Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos*. Mech Dev, 2000. **90**(2): p. 237-52.
56. Tamir, A., et al., *Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4452-64.
57. Pereira, R., et al., *FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts*. Oncogene, 1999. **18**(8): p. 1597-608.
58. Levy, R., et al., *A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6552-6.
59. Ellis, N.A., et al., *Cloning of PBDX, an MIC2-related gene that spans the pseudoautosomal boundary on chromosome Xp*. Nat Genet, 1994. **6**(4): p. 394-400.
60. Devaney, K., et al., *MIC2 detection in tumors of bone and adjacent soft tissues*. Clin Orthop Relat Res, 1995(310): p. 176-87.
61. Kovar, H., et al., *Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor*. Oncogene, 1990. **5**(7): p. 1067-70.
62. Sung, C.O., et al., *Immunoreactivity of CD99 in non-Hodgkin's lymphoma: unexpected frequent expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma*. J Korean Med Sci, 2005. **20**(6): p. 952-6.
63. Lucas, D.R., et al., *Ewing sarcoma vs lymphoblastic lymphoma. A comparative immunohistochemical study*. Am J Clin Pathol, 2001. **115**(1): p. 11-7.
64. Choi, Y.L., J.G. Chi, and Y.L. Suh, *CD99 immunoreactivity in ependymoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001. **9**(2): p. 125-9.
65. Goto, A., et al., *Prevalence of CD99 protein expression in pancreatic endocrine tumours (PETs)*. Histopathology, 2004. **45**(4): p. 384-92.
66. Milanezi, F., et al., *CD99/MIC-2 surface protein expression in breast carcinomas*. Histopathology, 2001. **39**(6): p. 578-83.
67. Ambros, I.M., et al., *MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration*. Cancer, 1991. **67**(7): p. 1886-93.
68. Ladanyi, M., et al., *EWS rearrangement in Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. Molecular detection and correlation with cytogenetic analysis and MIC2 expression*. Diagn Mol Pathol, 1993. **2**(3): p. 141-6.
69. Choi, E.Y., et al., *Engagement of CD99 induces up-regulation of TCR and MHC class I and II molecules on the surface of human thymocytes*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 749-54.
70. Bernard, G., et al., *Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2543-50.
71. Alberti, I., et al., *CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes*. FASEB J, 2002. **16**(14): p. 1946-8.
72. Jung, K.C., et al., *The CD99 signal enhances Fas-mediated apoptosis in the human leukemic cell line, Jurkat*. FEBS Lett, 2003. **554**(3): p. 478-84.
73. Schenkel, A.R., et al., *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 143-50.

74. Hahn, M.J., et al., *Differential activation of MAP kinase family members triggered by CD99 engagement*. FEBS Lett, 2000. **470**(3): p. 350-4.
75. Sohn, H.W., et al., *CD99 regulates the transport of MHC class I molecules from the Golgi complex to the cell surface*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 787-94.
76. Bernard, G., et al., *CD99 (E2) up-regulates alpha4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 3061-5.
77. Lee, E.J., et al., *CD99 type II is a determining factor for the differentiation of primitive neuroectodermal cells*. Exp Mol Med, 2003. **35**(5): p. 438-47.
78. Sohn, H.W., et al., *Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin-independent pathway in Ewing's sarcoma cells*. Am J Pathol, 1998. **153**(6): p. 1937-45.
79. Kreppel, M., et al., *Suppression of KCMF1 by constitutive high CD99 expression is involved in the migratory ability of Ewing's sarcoma cells*. Oncogene, 2006. **25**(19): p. 2795-800.
80. Balamuth, N.J. and R.B. Womer, *Ewing's sarcoma*. Lancet Oncol, 2010. **11**(2): p. 184-92.
81. Cupps, R.E., D.L. Ahmann, and E.H. Soule, *Treatment of pulmonary metastatic disease with radiation therapy and adjuvant actinomycin D. Preliminary observations*. Cancer, 1969. **24**(4): p. 719-23.
82. Samuels, M.L. and C.D. Howe, *Cyclophosphamide in the management of Ewing's sarcoma*. Cancer, 1967. **20**(6): p. 961-6.
83. Tan, C., et al., *Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia*. Cancer, 1967. **20**(3): p. 333-53.
84. James, D.H., Jr. and P. George, *Vincristine in Children with Malignant Solid Tumors*. J Pediatr, 1964. **64**: p. 534-41.
85. Meyer, W.H., et al., *Ifosfamide plus etoposide in newly diagnosed Ewing's sarcoma of bone*. J Clin Oncol, 1992. **10**(11): p. 1737-42.
86. Grier, H.E., et al., *Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone*. N Engl J Med, 2003. **348**(8): p. 694-701.
87. Miser, J.S., et al., *Treatment of metastatic Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of increasing the dose intensity of chemotherapy--a report from the Children's Oncology Group*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **49**(7): p. 894-900.
88. Meyers, P.A., et al., *High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis*. J Clin Oncol, 2001. **19**(11): p. 2812-20.
89. Oberlin, O., et al., *Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumors: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant*. J Clin Oncol, 2006. **24**(24): p. 3997-4002.
90. Burdach, S., et al., *Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Dusseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria*. Ann Oncol, 2000. **11**(11): p. 1451-62.

91. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
92. Zhou, Z., et al., *VEGF(165), but not VEGF(189), stimulates vasculogenesis and bone marrow cell migration into Ewing's sarcoma tumors in vivo*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(11): p. 1125-32.
93. Dalal, S., et al., *Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2364-78.
94. Lee, T.H., et al., *Production of VEGF165 by Ewing's sarcoma cells induces vasculogenesis and the incorporation of CD34+ stem cells into the expanding tumor vasculature*. Int J Cancer, 2006. **119**(4): p. 839-46.
95. Holzer, G., et al., *Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors*. Med Pediatr Oncol, 2001. **36**(6): p. 601-4.
96. Pavlakovic, H., et al., *Quantification of angiogenesis stimulators in children with solid malignancies*. Int J Cancer, 2001. **92**(5): p. 756-60.
97. Fuchs, B., C.Y. Inwards, and R. Janknecht, *Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(4): p. 1344-53.
98. Nagano, A., et al., *EWS/Fli-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A*. Int J Cancer, 2009. **126**(12): p. 2790-8.
99. Guan, H., et al., *A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(7): p. 2662-9.
100. Batchelor, T., et al., *A phase II trial of AZD2171 (cediranib), an oral pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **Part I. Vol 25**, (18S(June 20 Supplement)): p. 2001
101. Maris, J.M., et al., *Initial testing of the VEGFR inhibitor AZD2171 by the pediatric preclinical testing program*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(3): p. 581-7.
102. Maris, J.M., et al., *Initial testing (stage 1) of sunitinib by the pediatric preclinical testing program*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **51**(1): p. 42-8.
103. Timeus, F., et al., *In vitro antiproliferative and antimigratory activity of dasatinib in neuroblastoma and Ewing sarcoma cell lines*. Oncol Rep, 2008. **19**(2): p. 353-9.
104. Ikeda, A.K., et al., *ABT-869 inhibits the proliferation of Ewing Sarcoma cells and suppresses platelet-derived growth factor receptor beta and c-KIT signaling pathways*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(3): p. 653-60.
105. Olmos, D., et al., *Targeting the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Ewing's Sarcoma: Reality and Expectations*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 402508.
106. Martins, A.S., et al., *Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3532-40.
107. Huang, F., et al., *The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 161-70.

108. Kurmasheva, R.T., et al., *The insulin-like growth factor-1 receptor-targeting antibody, CP-751,871, suppresses tumor-derived VEGF and synergizes with rapamycin in models of childhood sarcoma.* Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7662-71.
109. Mateo-Lozano, S., O.M. Tirado, and V. Notario, *Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation.* Oncogene, 2003. **22**(58): p. 9282-7.
110. Zenali, M.J., et al., *Morphoproteomic confirmation of constitutively activated mTOR, ERK, and NF-kappaB pathways in Ewing family of tumors.* Ann Clin Lab Sci, 2009. **39**(2): p. 160-6.
111. Naing, A., et al., *Phase I Trial of Cixutumumab Combined with Temsirolimus in Patients with Advanced Cancer.* Clin Cancer Res, 2011.
112. Chan, J.H., S. Lim, and W.S. Wong, *Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(5-6): p. 533-40.
113. Patil, S.D., D.G. Rhodes, and D.J. Burgess, *DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review.* AAPS J, 2005. **7**(1): p. E61-77.
114. Tanaka, K., et al., *EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells.* J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 239-47.
115. Toretsky, J.A., et al., *Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides.* J Neurooncol, 1997. **31**(1-2): p. 9-16.
116. Young, P.J., et al., *The Ewing's sarcoma protein interacts with the Tudor domain of the survival motor neuron protein.* Brain Res Mol Brain Res, 2003. **119**(1): p. 37-49.
117. Spahn, L., et al., *Homotypic and heterotypic interactions of EWS, FLI1 and their oncogenic fusion protein.* Oncogene, 2003. **22**(44): p. 6819-29.
118. Villemeur, M., et al., *Comparative activity and specificity of antisense oligonucleotides and small interfering RNA in an in vitro Ewing sarcoma model.* The open nanomedicine journal, 2009. **2**: p. 27-36.
119. Lambert, G., et al., *EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 401-6.
120. Maksimenko, A., et al., *Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **1002**: p. 72-7.
121. Maksimenko, A., et al., *In vivo potentialities of EWS-Fli-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes.* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1058**: p. 52-61.
122. Maksimenko, A., et al., *Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies.* Pharm Res, 2003. **20**(10): p. 1565-7.
123. Elhames, H., et al., *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles.* Oligonucleotides, 2009. **19**(3): p. 255-64.
124. Scotlandi, K., et al., *CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors.* Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5134-42.
125. Scotlandi, K., et al., *Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma.* Eur J Cancer, 2006. **42**(1): p. 91-6.
126. Myatt, S.S. and S.A. Burchill, *The sensitivity of the Ewing's sarcoma family of tumours to fenretinide-induced cell death is increased by EWS-Fli1-dependent modulation of p38(MAPK) activity.* Oncogene, 2008. **27**(7): p. 985-96.

127. Myatt, S.S., C.P. Redfern, and S.A. Burchill, *p38MAPK-Dependent sensitivity of Ewing's sarcoma family of tumors to fenretinide-induced cell death*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 3136-48.
128. Erkizan, H.V., et al., *A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma*. Nat Med, 2009. **15**(7): p. 750-6.
129. Toretsky, J.A., et al., *Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5574-81.
130. Siddiqui, T., et al., *Effective salvage treatment of recurrent Ewing sarcoma utilizing chemotherapy and zoledronic acid*. Clin Adv Hematol Oncol, 2010. **8**(7): p. 499-504.
131. Zhou, Z., et al., *Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma*. Cancer, 2005. **104**(8): p. 1713-20.
132. Lu, G., V. Punj, and P.M. Chaudhary, *Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(4): p. 603-8.
133. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
134. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. Plant Cell, 1990. **2**(4): p. 279-289.
135. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
136. Kennerdell, J.R. and R.W. Carthew, *Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway*. Cell, 1998. **95**(7): p. 1017-26.
137. Elbashir, S.M., et al., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6877-88.
138. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
139. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(3): p. 173-84.
140. Martinez, L.A., et al., *Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14849-54.
141. Jackson, A.L., et al., *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 635-7.
142. Lin, X., et al., *siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(14): p. 4527-35.
143. Hornung, V., et al., *Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 263-70.
144. Judge, A.D., et al., *Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(4): p. 457-62.
145. Kariko, K., et al., *Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3*. Cells Tissues Organs, 2004. **177**(3): p. 132-8.

146. Kariko, K., et al., *Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6545-9.
147. Siligan, C., et al., *EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin*. Oncogene, 2005. **24**(15): p. 2512-24.
148. Dohjima, T., et al., *Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/Fli-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line*. Mol Ther, 2003. **7**(6): p. 811-6.
149. Chansky, H.A., et al., *Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro*. J Orthop Res, 2004. **22**(4): p. 910-7.
150. Maksimenko, A. and C. Malvy, *Oncogene-targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing sarcoma*. Expert Opin Ther Targets, 2005. **9**(4): p. 825-830.
151. Prieur, A., et al., *EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7275-83.
152. Toub, N., et al., *Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma*. Pharm Res, 2006. **23**(5): p. 892-900.
153. Kovar, H., et al., *EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro*. Cell Growth Differ, 1996. **7**(4): p. 429-37.
154. Ouchida, M., et al., *Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts*. Oncogene, 1995. **11**(6): p. 1049-54.
155. Vaerman, J.L., et al., *Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides*. Blood, 1997. **90**(1): p. 331-9.
156. Bertrand, J.R., et al., *Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(4): p. 1000-4.
157. Yamamoto, T., et al., *Simultaneous inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways augment the sensitivity to actinomycin D in Ewing sarcoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(8): p. 1125-36.
158. Hu-Lieskovan, S., et al., *Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8984-92.
159. Aleku, M., et al., *Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9788-98.
160. Santel, A., et al., *Atu027 prevents pulmonary metastasis in experimental and spontaneous mouse metastasis models*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(22): p. 5469-80.
161. Davis, M.E., *The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic*. Mol Pharm, 2009. **6**(3): p. 659-68.
162. Gollob, J., et al. *Interim safety and pharmacodynamic results for ALN-VSP02, a novel RNAi therapeutic for solid tumors with liver involvement*. in J Clin Oncol 2010.

163. de Martimprey, H., *et al.*, *Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: oligonucleotides and siRNA*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(3): p. 490-504.
164. Singha, K., R. Namgung, and W.J. Kim, *Polymers in Small-Interfering RNA Delivery*. Oligonucleotides, 2011.
165. Shegokar, R., L. Al Shaal, and P.R. Mishra, *SiRNA delivery: challenges and role of carrier systems*. Pharmazie, 2011. **66**(5): p. 313-8.
166. Jeong, J.H., T.G. Park, and S.H. Kim, *Self-assembled and nanostructured siRNA delivery systems*. Pharm Res, 2011. **28**(9): p. 2072-85.
167. Tamura, A. and Y. Nagasaki, *Smart siRNA delivery systems based on polymeric nanoassemblies and nanoparticles*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(7): p. 1089-102.
168. Posadas, I., F.J. Guerra, and V. Cena, *Nonviral vectors for the delivery of small interfering RNAs to the CNS*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(8): p. 1219-36.
169. Wang, J., *et al.*, *Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers*. AAPS J, 2010. **12**(4): p. 492-503.
170. de Martimprey, H., *et al.*, *New core-shell nanoparticules for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma*. Pharm Res, 2010. **27**(3): p. 498-509.
171. de Martimprey, H., *et al.*, *siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. e2.
172. Vauthier, C., D. Labarre, and G. Ponchel, *Design aspects of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery*. J Drug Target, 2007. **15**(10): p. 641-63.
173. Nicolas, J. and P. Couvreur, *Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009. **1**(1): p. 111-27.
174. Kolhatkar, R., A. Lote, and H. Khambati, *Active tumor targeting of nanomaterials using folic acid, transferrin and integrin receptors*. Curr Drug Discov Technol. **8**(3): p. 197-206.
175. Fay, F. and C.J. Scott, *Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy*. Immunotherapy. **3**(3): p. 381-94.

Première partie :

Choix d'une séquence de siRNA dirigée
contre EWS/Fli-1

Choice of a siRNA sequence directed against EWS/Fli-1 junction

Ramon AL^{a,b,c,d}, Bertrand JR^{a,d}, Malvy C^{a,d}

a CNRS UMR 8203 Vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex

b Univ Paris-Sud, PhysicoChimie, Pharmacotechnie et biopharmacie, UMR CNRS 8612, F92296 Châtenay-Malabry

c CNRS, F- 92296 Châtenay-Malabry

d Univ Paris-Sud, F-94805 Villejuif

Corresponding author :

Claude Malvy

Claude.malvy@igr.fr

1. Introduction

Ewing's sarcoma is a highly metastatic bone and soft tissue tumor that affects children and young adults with a peak incidence at 15 years old. Its incidence rate is 1 to 3 per million. It is more common in males and occurs most often in European populations [176-178]. Ewing's sarcoma is mainly treated by surgery to reduce the size of the tumor, associated radiotherapy and chemotherapy [179]. The survival rate is 50% at 5 years, it decreases to 25% in the presence of metastases and is less than 30% at 10 years in case of metastases at diagnosis [180]. Ewing's sarcoma was first described in 1921 by James Ewing as the diffuse endothelioma of bone [181] and belong to the family of primitive neuroectodermal tumor (PNET). Morphologically, it is formed of small round cells with a high ratio nucleus/cytoplasm, whose origin is still unclear. The most likely hypothesis is that they come from mesenchymal stem cells [11, 182]. Ewing's sarcoma is characterized by the presence of oncogenic fusion protein EWS and partners. The junction type 1 EWS/Fli-1 is the most common and is found in 85% of cases of Ewing's sarcoma [10]. It corresponds to the translocation $t(11; 22)(q24; q12)$ which associates EWS gene fragment to a fragment of the gene Fli-1 (Friend Leukemia virus integration-1) [183]. This fusion gene is translated into a chimeric protein that includes the transactivation domain of EWS and the DNA-binding transcription factor of Fli-1 resulting in an aberrant transcription factor [24]. May *et al.* showed that the expression of EWS/Fli-1 in the NIH/3T3 cells is able to transform them [25], which shows the oncogenic nature of EWS/Fli-1.

This chimerical protein is involved in the activation of genes responsible for physiological alterations generating tumorigenesis. Among these factors we find self-

sufficiency for growth factors, insensitivity to inhibitory signals, apoptosis escape, maintenance of angiogenesis, immortality, tissue invasion and metastasis [184].

From these results, it can therefore be hypothesized that the expression of this fusion protein in a cell is responsible for its malignant transformation and tumor spread.

Chemotherapy is effective in the treatment of cancer. However, tumor cells often become resistant and chemotherapy is highly toxic. Resistance to treatment may be due to the ability of tumor cells to escape the control of cell cycle progression, thus allowing uncontrolled proliferation despite the damages induced by chemotherapy or to the ability of the cancerous cell to escape apoptosis. EWS/Fli-1 may be related in a direct or indirect way to both phenomena. Methods for the specific inhibition of the expression of that junction oncogene are thus very important for the therapy of cancer.

From this point of view small interfering RNAs (siRNAs) which target the junction area of the messenger RNA (mRNA) of EWS/Fli-1 could be used to make tumor cells more sensitive to treatment by allowing to abolish the expression of the protein EWS/Fli-1 [135].

The siRNAs are small double-stranded RNAs of 21-23 nucleotides. They interact with the RNA-induced silencing complex (RISC) in which the two strands of siRNA are dissociated. The passenger strand is removed while the antisense strand guides the RISC complex activated. The RISC complex / antisense strand can recognize the sequence of the target messenger RNA. RISC degrades mRNA specifically at the recognition area [185-186].

The siRNAs are hydrophilic and polyanionic in nature, which makes penetration in the cells very difficult [187]. In addition, the anti-tumor efficacy of siRNA is limited by the fact that they are relatively unstable in the bloodstream. They are rapidly

eliminated by various means: degradation by ribonucleases, fast renal excretion and non-specific accumulation in the reticuloendothelial system [188]. Nanoparticles of poly(alkylcyanoacrylate) and chitosan (PACA/Chitosan) of small size combined with an anti-CD99 antibody capable of delivering siRNA *in vivo* have been developed CD99 being a marker over-expressed by the cells of Ewing's sarcoma. The targeting of nanoparticles allows them to deliver the siRNAs in a larger amount compared to nanoparticles lacking ligand. In addition, inhibition of EWS/Fli-1 in Ewing's sarcoma xenografts in mice is improved by the targeting of nanoparticles. Finally targeting significantly reduces the doses used *in vivo* while maintaining a satisfactory effectiveness of the treatment.

This project aims to validate and compare the anti-tumor efficacy of five sequences of siRNAs directed against the junction region of mRNA EWS/Fli-1 (figure1) *in vitro*.

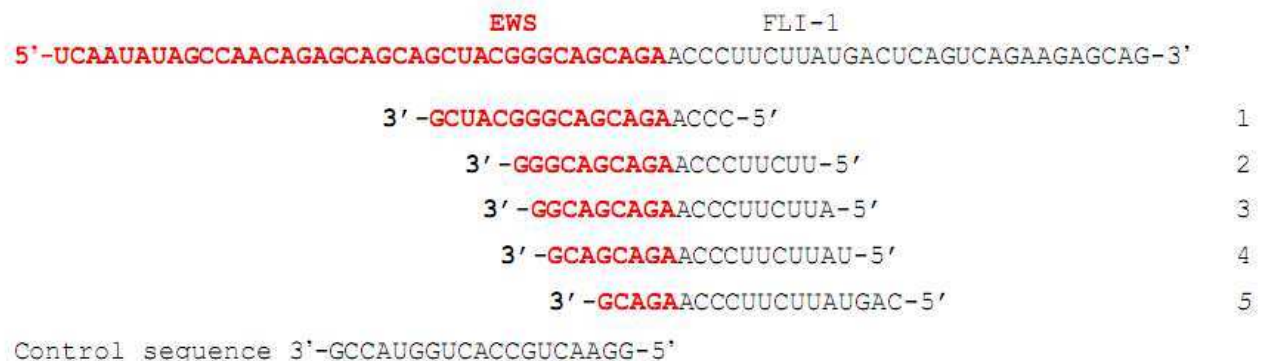


Figure 1 : Sequences of siRNA directed against the EWS/Fli-1 junction and control siRNA sequence.

In this part we will study of the effects of siRNAs in which sequences are placed in various points of the junction *in vitro*. This will be evaluated on EWS/Fli-1 expression at the mRNA and protein levels. We chose to work with two human cell lines, A673

and TC71 Ewing's sarcoma. A673 cells were chosen because they are frequently used *in vitro* and *in vivo* as a model for the study of Ewing's sarcoma [189-192] and because they are used successfully *in vivo* in our team (unpublished data). TC71 cells were selected because they come from patients in relapse and have been previously treated with vincristine, cyclophosphamide and actinomycin. In addition, our team has developed a model of metastatic Ewing's sarcoma based on the use of these cells in mice. The effect of treatment with siRNAs on cell cycle progression of tumor cells of Ewing's sarcoma and the eventual restoration of apoptosis when the oncogene EWS/Fli-1 is inhibited will also be investigated.

2. Material and methods

2.1. Cell treatment for q-RT-PCR, western blot analysis of EWS/fli-1 and MTT testing

To reach a total inhibition of EWS/Fli-1 we used a double transfection protocol previously described by Prieur *et al.* 3.10^5 A673 or TC71 Ewing cells per well were plated in 6-well plates (TPP, Dominique Dutscher SAS, France) and cultured for 24 hours in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin. The cells were treated using 50nM of siRNA duplexes using lipofectamine (Invitrogen, USA) in OptiMEM (Invitrogen, USA). After 24 hours, cells were washed with PBS buffer and harvested for analysis or medium was replaced by fresh one and cells were grown for 48 hours and plated again at 3.10^5 per well in 6-well plates. After another 24hours cells were treated again with 50nM of siRNA duplexes using lipofectamine (Invitrogen, USA) in OptiMEM (Invitrogen, USA) for 24 hours and then washed with PBS buffer and harvested in Trizol® reagent (Invitrogen, USA) or RIPA buffer (50mM Tris-cl pH 7.4. 150mM NaCl. 1% NP40. 0.25% Na-deoxycholate) with protease inhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Germany).

2.2. Cell treatment for apoptosis and cell cycle analysis

A673 and TC71 cells were plated at 1.5×10^5 cells/well in 12 wells (TPP, Dominique Dutscher SAS, France) plated 24 hours before treatment in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin. Cells were treated with siRNA/lipofectamine complexes at

50nM in OptiMEM for 4 hours. Then the OptiMEM medium was replaced by fresh complete medium up to 24 hours or 48 hours. For apoptosis positive control cells were cultured in the same condition and irradiated at 8Gy 24hours or 48 hours before analysis

2.3. q-RT-PCR analysis

For q-RT-PCR analysis cells were treated as described above and harvested in 800µL of Trizol® reagent (Invitrogen, USA). Then 160µL of Chloroform was added, vortexed for 10 seconds and centrifugated 15 minutes at 12000xg in order to separate aqueous phase from lipophilic one. 350 µl of supernatant was precipitated using 350µL of isopropyl alcohol and centrifugated at 12000xg for 15 min. The pellet was washed two times with 1mL of 70% ethanol and resuspended in milliQ water containing 0.5 U/µL of RNasin (Promega). Resulting total RNA were quantified using optic density determination.

For Reverse transcription, 1µg of total RNA were diluted in 14.5µL of water containing 2µl of random primer (Promega) at 50 µg/mL and placed for 5min at 65°C. 4µL 5XRT buffer (Biolabs), 0.5µL of dNTP 20 mM (Promega), 0.5 µL of RNasin 40 U/µL (Promega) et 0.5 µL of MoMuLV reverse transcriptase 200U/µL (Biolabs) were added in samples and incubated at 42°C for 1 hour.

For quantitative PCR, cDNA samples were diluted in milliQ water at 1:20. Then 5µL of diluted cDNA, 12.5µL of Sybergreen reagent (Invitrogen, USA), 1µL of Forward primer, 1µL of reverse primer and 5.5µL of milliQ water were mixed and analyzed using an Applied Biosystems PCR machine.

2.4. Western Blot analysis

For EWS/Fli-1 western blot analysis cells were treated as described above and harvested in RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4. 150mM NaCl. 1% NP40. 0.25% Na-deoxycholate) with protease inhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Germany). Protein concentration was determined using 96-well BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). 250µg of proteins were diluted in 1mL of RIPA buffer with protease inhibitor and 1µL of Fli-1 antibody (SantaCruz Biotechnology, USA) and allow reacting overnight. Then 20µL of Protein G Sepharose®, Fast Flow (Sigma-Aldrich, USA) was added and incubated at 4°C on a rotating wheel for 2 hours. After incubation, samples were centrifugated and supernatant was replaced by 20µL of western blot buffer and heated for 10 min at 95°C then centrifugated. The supernatant was migrated in SDS PAGE agarose gel and revealed using Fli-1 antibody (SantaCruz Biotechnology, USA).

2.5. MTT

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) was used to assess cell viability after treatment with siRNA. MTT powder (Sigma-Aldrich) was solubilized in PBS buffer at a concentration of 5mg/mL. At the time of analysis, cell medium was replaced by 900µL of fresh culture medium and 100µL of the previously prepared MTT solution was added and let to react in culture conditions. After 3 hours, 1 mL of lysis medium made of 10mM HCL/10% sodium docecyl sulfate was added to each well. After overnight lysis of the cells, the medium contained in each well was homogeneized and 200 µL was placed in 96-well plate (TPP, Dominique Dutscher SAS, France) in duplicate. The absorbance of the formazan produced was measured at 570 nm wavelength on a plate reader (MRX2, Dynex Technologies, USA). Results

are expressed in percentage using untreated cells as the residual absorbance reference.

2.6. Nuclear staining

For nuclear staining cells were cultured on 18-mm coverslip (Sigma-Aldrich) at 1.5×10^5 cells/well in 24-well plates (TPP, Dominique Dutscher SAS, France). After 24h or 48h of siRNA/lipofectamine treatment, cells were washed with PBS buffer and mounted on slides using 10 μ L of DAPI-Fluoromount-G (SouthernBiotech, USA). Slides were analyzed using an reversed fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) at 455nm and Axiovision software (Carl Zeiss, Germany).

2.7. Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, cells were treated 24h like previously described before analysis. Then 2×10^5 cells were fixed in 70% ethanol for 30 min. After cells fixation, cells were pelleted and resuspended in 200 μ L of a coloration mixture containing 20mM EDTA 0.5M pH8, 200 μ L 2.5 μ g/mL of propidium iodide and 50 μ g/mL of RNase. After 1 hour incubation samples were analyzed using an Accuri C6 Flow cytometer (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA).

2.8. Annexin V analysis

Cell apoptosis was determined using the ApopNexin™ FITC Apoptosis Detection Kit (Millipore, USA) according to the manufacturer's protocol. Cells lines were treated as described above and harvested after 24h or 48h. After PBS washings, cells were resuspended in 200 μ L of 1X binding buffer and stained with 2 μ L of ApopNexin™

FITC and 3µL of propidium iodide (20µg/mL). After 15min of incubation at room temperature, cells were analyzed by flow cytometer using an Accuri C6 Flow cytometer (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA) and results treated with CFlow software (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA). Data from 10 000 cells were collected for each sample.

2.9. Caspase involvement in cellular death

Cells were treated as previously described with siRNA for 24h or 48h. Control samples were irradiated at 8Gy 24 or 48h prior analysis. For determination of caspase activation we used Guava MultiCaspase kit (Millipore) as described by the manufacturer. Guava caspase reagents are membrane permeable fluorescent markers allowing to measure intracellular levels of the enzyme and identifies active caspases. The Guava Caspase Assays also include 7-AAD to simultaneously evaluate membrane integrity and cell viability by staining nucleus if the membrane is damaged. The Apoptosis Wash Bufer 10X was diuted in sterile water, Caspase reagent in PBS 1X (1:25). 100µL of cell suspension were placed in clear 5mL flow cytometry tubes at $5 \cdot 10^5$ cells/mL and 10µL of diluted Caspase Reagent was added to each well and incubated 1 hour at 37°C under normal culture conditions. After incubation, 100µL of Apoptosis Wash Buffer was added in each well and centrifugated 5 minutes at 5000 rpm; Supernatant was carefully removed. A work solution of Caspase 7-AAD was prepared by diluting the Caspase 7-AAD (1:40) in 1X apoptosis Wash Buffer. 200µL of Caspase 7-AAD working solution was then added in each well and incubated 10 minutes at room temperature. Cells were then analyzed by flow cytometer using an Accuri C6 Flow cytometer (Accuri Cytometers,

Inc. Ann Arbor, MI USA) and results treated with CFlow software (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA). Data from 10 000 cells were collected for each sample.

3. Results

3.1. EWS/Fli-1 mRNA and protein inhibition

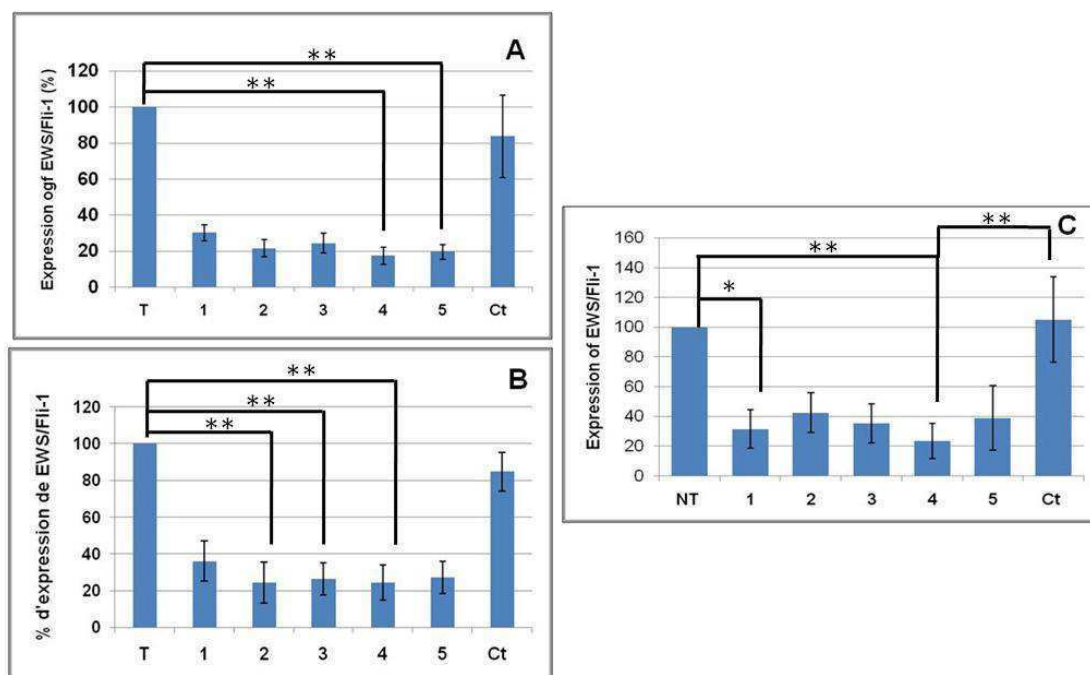


Figure 2: Expression of EWS/Fli1 PCR A = A673 double transfection, B = TC71

simple transfection, C= EF simple transfection (Statistics: Kruskal-Wallis test *p <

0.01, *p < 0.05, n=6)

After one transfection with the five sequence of siRNA only the EF cell line reached a complete inhibition of EWS/Fli-1 at an mRNA level (figure 2). However, A673 and TC71 cell lines needed to undergo two transfections to reach the same level of inhibition of the mRNA. Inhibition of the protein EWS/Fli-1 can also be found in western blot after double transfection (figure 3). Moreover, the results of the MTT

assay show that only the sequences noted 2 and 4 could trigger a decrease of cell survival (figure 4).

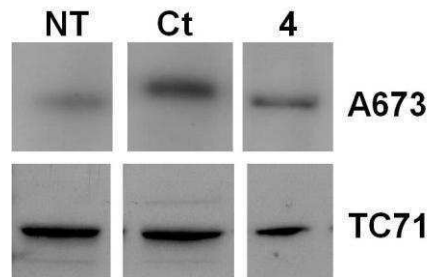


Figure 3: Western Blot A673 et TC71. NT : untreated cells, Ct : Cells treated with control siRNA, 4 : cells treated with the sequence of EWS/Fli-1 siRNA number 4 (see figure 1 for the corresponding sequence)

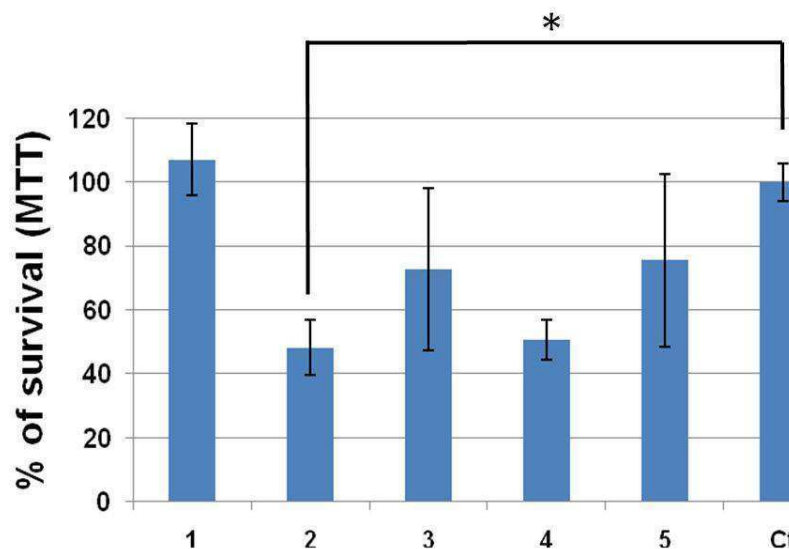


Figure 4: Survival of A673 cells after double transfection with various siRNA sequences evaluated by a MTT assay. Ct: control sequence. (Statistics: Kruskal-Wallis test *p < 0.01, *p < 0.05, n=6)

3.2. Effect of treatment with siRNA on the cell cycle of tumor cells:

Propidium iodide (PI) is a DNA intercalating agent which is characterized by an excitation wavelength of 450 nm and an emission wavelength with a broad spectrum

around 600 nm. The fluorescence intensity of PI bound to DNA is relative to the amount of DNA in the cell. Each stage of the cell cycle is characterized by a specific amount of DNA in the cell [193-194]. In G1 phase cells are diploid. S phase, DNA starts to replicate, leading to an increase in fluorescence intensity. Intensity that reaches twice the value of G1 cells in G2/M (tetraploid cells). This technique allowed us to explore the effect of treatment with the different sequences of EWS/Fli-1 siRNAs (1, 2, 3, 4, 5 and control) on the cell cycle of A673 and TC71 cells. Figure 5 shows the percentages of cells (TC71 and A673) that are in G1, S or G2 depending on the siRNA used for treatment. We observed a cell cycle arrest in G1 in A673 cells treated with siRNA compared to untreated cells or cells treated with a control siRNA (figure 5A). Following treatment with siRNA 2 to 5 directed against EWS/Fli-1 junction, 70 to 80% of the cells were in G1 phase. For siRNA sequence number 1, untreated cells or cells treated with control siRNA, only 40% of cells are found in G1 phase and the repartition between G1 and G2 is homogenous. For TC71 cells (figure 5B) we did not observe any changes in the repartition of cells in the various phases when cells were treated with siRNA directed against EWS/Fli-1 junction, control siRNA or untreated. The repartition of the cells was homogenous between G1 and G2 with 40% of the cells in each phase.

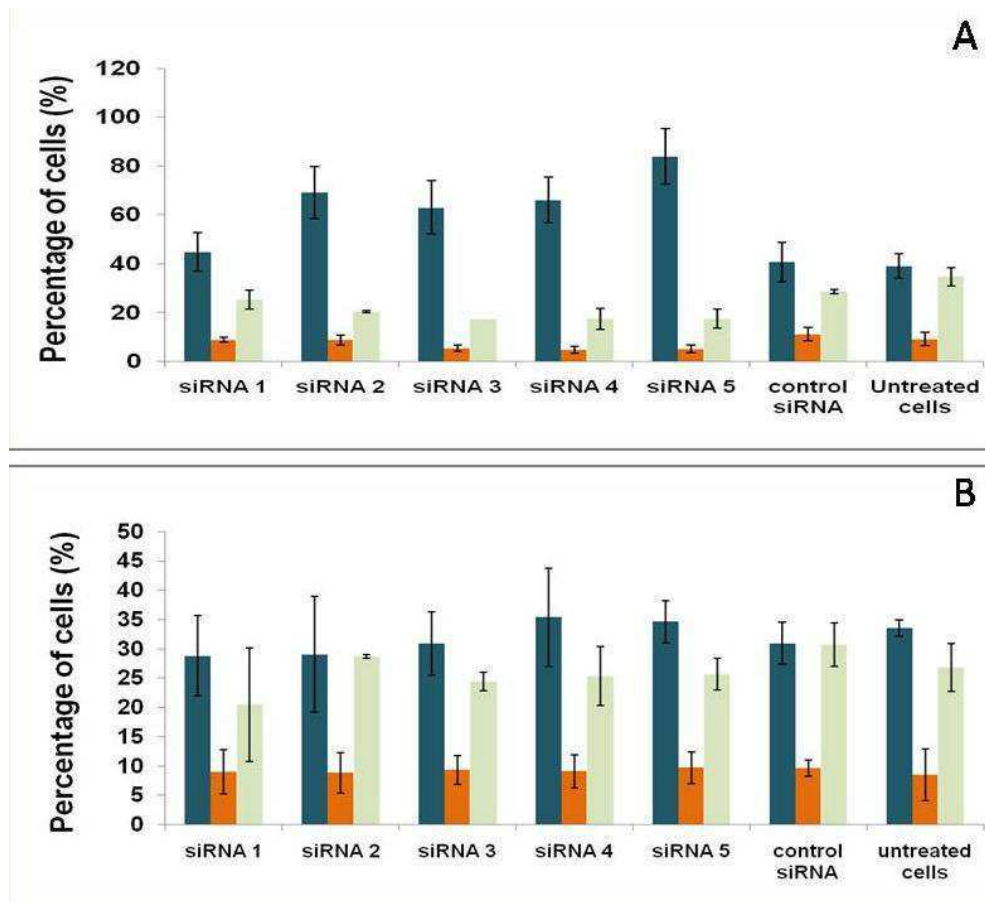


Figure 5: Effect of siRNA treatment (50nm, 24h) on the cell cycle of A673 cells (A) and TC71 cells. G1 phase (■), S phase (■), G2 phase (■).

3.3. Effect of the treatment with siRNAs on the ability of A673 and TC71 cells to evade apoptosis

The 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) is a molecule that is able to bind to DNA. It absorbs UV light and emits a blue fluorescence that permit to detect DNA and to visualize the shape of the nuclei with a fluorescence microscope. We studied the appearance of A673 cell nuclei after treatment with siRNA (24h and 48h). The results are shown in Figure 6.

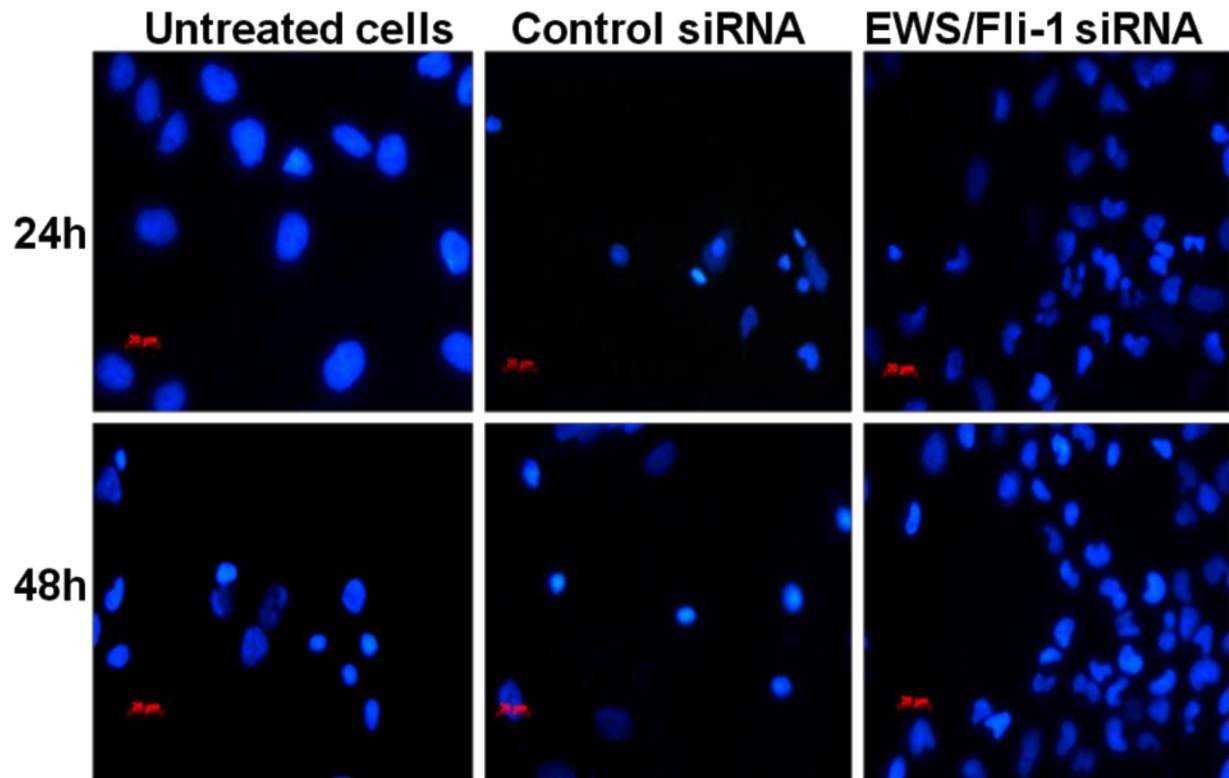


Figure 6: Fluorescence microscopy images of A673 cells treated with siRNA EWS/Fli-1 or control siRNA or untreated after 24h or 48h. DAPI staining. Scale bar = 20 μm

The nuclei of cells treated with the siRNA EWS/Fli-1 after 24h and 48h shown a lobed and fragmented aspect. On the contrary, the nuclei of cells treated with control siRNA and untreated cells were found to be oval and regular. This suggested that cellular changes could occur during treatment, such as induction of cell death.

Non-apoptotic cells are characterized by the presence of phosphatidylserine exclusively on the inner surface of the cytoplasmic membrane. In contrast, in apoptotic cells, the phosphatidylserine relocates and is detected outside of the membrane [195].

The Annexin V has a high affinity for phosphatidylserine and is used to label apoptotic cells. Propidium iodide (PI) is used to distinguish dead cells. Cells in early apoptosis are Annexin +/IP-, late apoptotic cells are Annexin +/ IP+ and necrotic cells are AnnexineV-/IP + [195-196]. This technique allowed us to explore different aspects of cell death following treatment with siRNA directed against EWS/Fli-1 (sequence 4). It allowed us to analyze the ability of TC71 and A673 cells to undergo apoptosis after this treatment. Figures 7 and 8 show the amount of cells that are in the early and late stages of apoptosis compared to untreated cells.

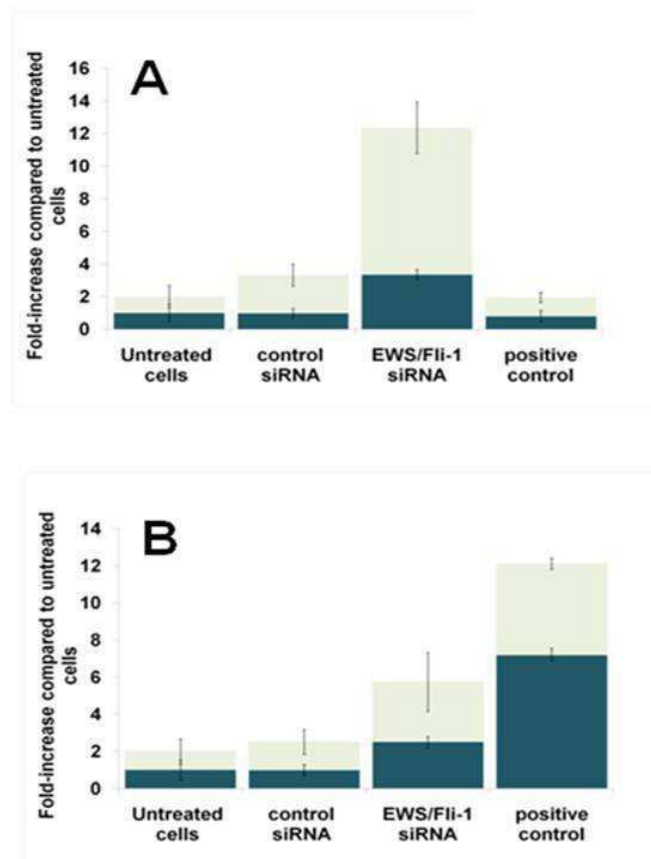


Figure 7: Apoptosis of A673 24h (A) and 48h (B) after siRNA treatment. Late apoptosis (■) and early apoptosis (■)

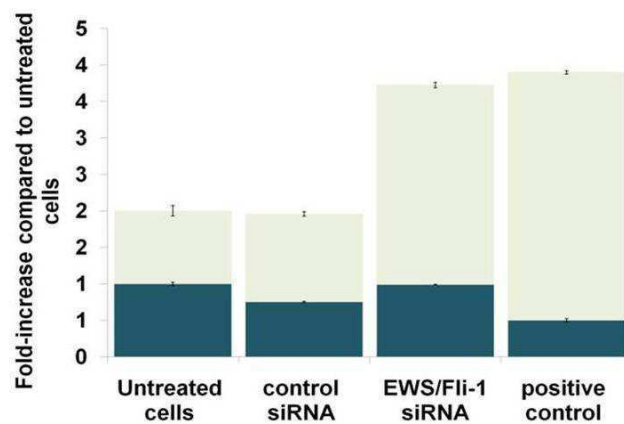


Figure 8: Apoptosis of TC71 24h after siRNA treatment. Late apoptosis (■) and early apoptosis (■)

The treatment of A673 and TC71 cells with siRNA EWS/Fli-1 caused increased cell death. In A673, the rate of apoptotic cells was multiplied by 9 in the presence of siRNA EWS/Fli-1 compared to untreated cells, whereas treatment with control siRNA increased this value by a factor of 4 (figure 7). For TC71 cells, the rate of apoptotic cells was multiplied by 4 in the presence of siRNA EWS/Fli-1 compared to untreated cells, whereas treatment with control siRNA increases this value by a factor of 2 (figure 8).

3.4. Highlighting the molecular basis of cell death of tumor cells after treatment with siRNA

Caspases are enzymes that play a central role in the process of cell death by apoptosis. They form three groups: the caspases that initiate the cascade of apoptosis (caspase-2, -8, -9 and -10), the caspases that execute cell death (-3, -6 and -7) and those that cleave cytokines (-1, -4, -5, -11 to -14) [197]. Guava

Multicaspases kit (Millipore) allowed us to quantify the percentage of cells in which cell death is dependent on the activation of the caspase. The measurements are made with Multicaspase Reagent which contains a peptide that binds covalently to the active site of caspases, regardless of the type of activated caspases. This peptide is linked to a fluorochrome that can be detected after fixing the cells. The resulting fluorescence signal is proportional to the amount of cleaved caspases. It is detected and analyzed by FACS.

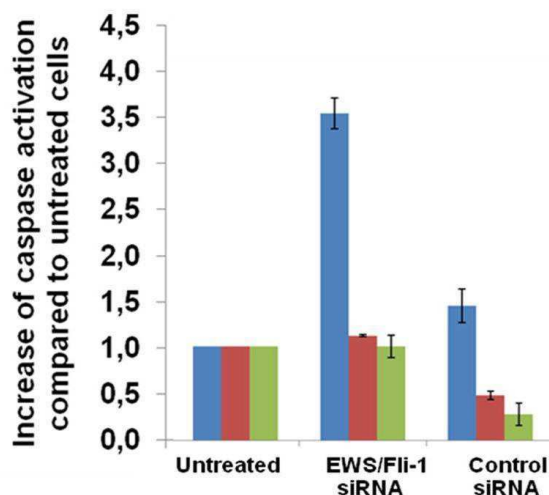


Figure 9: Caspase cell death 24h after transfection on A673 cells. Caspase dependant cell death (■), caspase independent cell death (■), live cells (■).

The 7-AAD is an indicator of membrane integrity. Viable cells and cells in early stages of apoptosis are not permeable to 7-AAD in contrast to cells that are in late stages of apoptosis or those that are necrotic. The cells are Multicaspase Reagent-/7-AAD- viable cells Multicaspase Reagent +/7-AAD- cells were at an early stage of apoptosis triggered by activation of the caspase, those Multicaspase Reagent +/7-AAD+ were cells at a late stage of apoptosis related to activation of the caspases.

For both TC71 and A673 cells (figures 9 and 10), an increase by a factor of 3 to 4 of cells with caspase activation after treatment with siRNA anti EWS/Fli-1 was found. The control siRNA only induced an increase of a factor of 1,5.

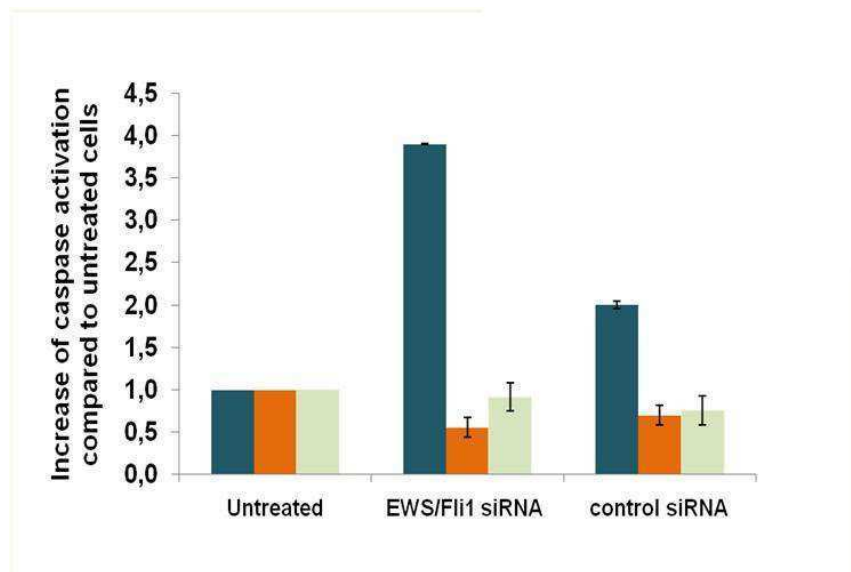


Figure 10: Caspase cell death 24h after transfection on TC71 cells. Caspase induced cell death (■), caspase independent cell death (■), live cells (■).

4. Discussion

In this work we compared the antitumor efficacy of five siRNAs directed against the junction region of EWS/Fli-1. The studies were conducted *in vitro* on the model of the previous work by de Martimprey *et al.* in the case of papillary thyroid cancer [171]. The effectiveness of five siRNA sequences located in different parts of the EWS/Fli-1 junction (Figure 1) were studied in terms of inhibition of the gene expression at the mRNA (figure 2) and at the protein (figure 3) levels but also in

terms of apoptosis (figures 6,7,8,9 and 10), cell growth (figure 4) and cell cycle (figure 5).

The cells previously used in our team were murine cells transformed by the EWS/Fli-1 oncogene. If inserting EWS/Fli-1 in NIH/3T3 cells is responsible for their malignant transformation [25, 198] it seems that this model is not appropriate because it was shown that the gene expression profile in microarray of NIH/3T3 cells expressing EWS/Fli-1 differed from the one of human cells from human ESFT [199]. In contrast to previous work presented by our team on ESFT [120-121, 123, 152] we have therefore chosen to work on human cells.

We chose to use two human cell lines of Ewing's sarcoma, named A673 and TC71. A673 cells were chosen because they are often used in the literature and are characteristic of a human Ewing's sarcoma [189, 200-203]. A673 cells are human cells thought to be derived from patients with primary rhabdomyosarcoma until a more thorough characterization showed that they belonged to the ESFT [204]. TC71 cells were chosen because they are human cells from a patient who relapsed after treatment with cyclophosphamide, vincristine, actinomycin and adriamycin [201] and are able to form metastases in mice after intravenous injection [158, 205].

Thanks to the selected siRNA sequences, we were able to effectively inhibit EWS/Fli-1 at the mRNA and protein level in our two cell lines, A673 and TC71 (figures 2 and 3). Unlike papillary thyroid cancer no sequence could be considered significantly more efficient than the others in terms of inhibition of gene expression at the messenger and protein level. In contrary to what can be found in the literature [206-207], we were able to demonstrate a decrease in cell growth after EWS/Fli-1 inhibition in A673 cells. This decrease was higher for sequences 2 and 4 (figure 4).

In an attempt to discriminate the five sequences used we studied the effect of inhibiting EWS/Fli-1 on the cell cycle of A673 and TC71 cells. We showed that inhibiting the expression of the EWS/Fli-1 oncogene in A673 cells led to cell cycle arrest in G1 phase for 80% of the cells (figure 5A) but had no effect on the cell cycle of the TC71 cells (figure 5B) whereas the two lines, A673 and TC71 have the same inhibition EWS/Fli-1 at the messenger and protein level.

The study of the regulation of the cell cycle of tumor cells of Ewing's sarcoma is made difficult by the fact that the origin of these cells is unclear. It is therefore difficult to identify the genes that are down- or up-regulated when compared to the original cells in healthy tissue. In a normal cell, the cell cycle progression is highly regulated. The cell cycle consists of four phases that can be grouped into two general processes which are: interphase and mitosis. The interphase is composed of three distinct phases: the phases G1, S and G2. These phases are involved in cell proliferation and genome replication. During mitosis (M phase) cells enter a division phase which ends with the formation of two identical daughter cells [208]. The G1 is the most important phase of the cell cycle in that it represents the first line of defense against oncogenic transformation. During this phase, the cell checks the integrity of its genome prior to entering the phases of proliferation. There are several levels of controls to ensure that the cells that carry mutations or chromosomal aberrations are not in S phase [209]. Studies have already shown a correlation between the expression level of EWS/Fli-1 and the rate of cyclin D1 and E in SK-N-MC and TC71 cells. The expression of EWS/Fli-1 induces the expression of cyclins D1 and E [210-211]. Zhang *et al.* also showed that this regulation was linked to the expression of EWS/Fli-1 and not to the cell type [210]. It was also shown that EWS/Fli-1 increases

the expression of cyclin D1 in A673 cells [212]. In addition, inhibition of EWS/Fli-1 in TC71 cells led to an increase in the number of TC71 cells in G0-G1 [210]. In our study, inhibition of EWS/Fli-1 induces an accumulation of cells in G1 phase for the A673 cells but not for the TC71 cells. Presumably, the regulation of cell cycle does not depend directly or not anymore on the expression of EWS/Fli-1 in our lineage, perhaps because of a drift phenomenon of this cell line. But another reason could be that longer time after transfection is needed to see any changes in the cell cycle of TC71, which was not required with A673 cells. Hence further experiments need to be conducted at different times for TC71 cells.

Other alterations are responsible for the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells which escape to apoptosis and immortality [11]. To evaluate the antitumor efficacy of siRNA, it was necessary to analyze the different mechanisms of cell death. Cell death can occur in two different aspects which are apoptosis and necrosis. Necrosis occurs when cells are exposed to changes in their physiological environment that can cause damage to the cell membrane. In normal physiological conditions the membrane damage can be caused by certain chemicals or treatments that can cause alterations in plasma membrane. During necrosis, cells swell and burst, releasing toxic contents into surrounding tissues causing the spread of necrosis and inflammatory response [213]. Unlike necrosis, apoptotic cell death occurs in normal physiological conditions, it is highly regulated, it involves individual cells in a tissue and it does not cause inflammation [214-215]. The effect of siRNA transfection on cell death was investigated by morphological observation of the shape of the nucleus of A673 cells after treatment (figure 6). Indeed, the nuclei of necrotic cells were not altered whereas apoptotic cells were characterized by condensation and fragmentation of chromatin [214-215]. Using fluorescence microscopy on A673 cells,

we observed a change in the morphology of the nucleus after treatment with a siRNA directed against EWS/Fli-1, which was not found with control siRNA (figure 6).

Furthermore, the treatment of A673 and TC71 cell caused cell death by apoptosis compared to the cells treated with control siRNA and compared to the untreated cells. Furthermore, treatment with the EWS/Fli-1 siRNA induced caspase activation in both A673 and TC71 cell lines (figures 9 and 10). This activation was not found after treatment with the control siRNA.

The fact that the treatment with the EWS/Fli-1 siRNA increased apoptosis suggests that it could be beneficial to try combinations with agents that trigger apoptosis, including ionizing radiation and cytotoxic molecules.

5. Conclusion and outlooks

ESFT are very aggressive types of cancers and their prognosis remains poor. Tumors usually have a wide variety of genetic defects, making the development of new treatments a complex task. In the case of ESFT, it is known that the emergence of the disease is based on the appearance of a single abnormality in 85% of cases, the EWS/Fli-1 fusion oncogene. The development of inhibitors of EWS / Fli-1 appears to be an interesting way in the therapeutic strategy for Ewing's sarcoma. The aim of this study was to design and test a new drug candidate to treat Ewing's sarcoma which takes advantage of the presence of EWS/Fli-1 in cancer cells. This work consisted of the evaluation and comparison of the *in vitro* efficacy of five siRNA sequences placed at various locations of the junction. All the sequences tested inhibited EWS/Fli-1 at the messenger and protein level. Similarly the different

sequences tested were equally effective in terms of effects on cell cycle. However, we should now evaluate the effect of these sequences on the protein EWS alone to ensure the specificity of those sequences.

6. Bibliography

1. Stiller, C.A. and D.M. Parkin, *Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer*. Br Med Bull, 1996. **52**(4): p. 682-703.
2. Hense, H.W., et al., *[Descriptive epidemiology of Ewing's tumor--analysis of German patients from (EI)CESS 1980-1997]*. Klin Padiatr, 1999. **211**(4): p. 271-5.
3. Cotterill, S.J., et al., *Incidence and survival for cancer in children and young adults in the North of England, 1968-1995: a report from the Northern Region Young Persons' Malignant Disease Registry*. Br J Cancer, 2000. **83**(3): p. 397-403.
4. Meyers, P.A. and A.S. Levy, *Ewing's sarcoma*. Curr Treat Options Oncol, 2000. **1**(3): p. 247-57.
5. Riggi, N. and I. Stamenkovic, *The Biology of Ewing sarcoma*. Cancer Lett, 2007. **254**(1): p. 1-10.
6. Ewing, J., *Diffuse endothelioma of bone*. Proc. N.Y. Pathol. Soc. 21, 1921: p. 17-24.
7. Riggi, N., et al., *Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11459-68.
8. Tirode, F., et al., *Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors*. Cancer Cell, 2007. **11**(5): p. 421-9.
9. Turc-Carel, C., et al., *Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12)*. Cancer Genet Cytogenet, 1988. **32**(2): p. 229-38.
10. Delattre, O., et al., *Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours*. Nature, 1992. **359**(6391): p. 162-5.
11. May, W.A., et al., *Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5752-6.
12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
13. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
14. Maksimenko, A.V., *Experimental antioxidant biotherapy for protection of the vascular wall by modified forms of superoxide dismutase and catalase*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(16): p. 2007-16.
15. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
16. Stein, C.A., et al., *Dynamics of the internalization of phosphodiester oligodeoxynucleotides in HL60 cells*. Biochemistry, 1993. **32**(18): p. 4855-61.
17. Whitehead, K.A., R. Langer, and D.G. Anderson, *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(2): p. 129-38.
18. Beltran, P.J., et al., *Efficacy of ganitumab (AMG 479), alone and in combination with rapamycin, in Ewing's and osteogenic sarcoma models*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **337**(3): p. 644-54.
19. Nagano, A., et al., *EWS/Fli-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A*. Int J Cancer, 2010. **126**(12): p. 2790-8.

20. Dubois, S.G., et al., *Flow cytometric detection of Ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow*. *Pediatr Blood Cancer*, 2010. **54**(1): p. 13-8.
21. Toomey, E.C., J.D. Schiffman, and S.L. Lessnick, *Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma*. *oncogene*, 2010. **29**: p. 4504-4516.
22. Crissman, H.A. and J.A. Steinkamp, *Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations*. *J Cell Biol*, 1973. **59**(3): p. 766-71.
23. Krishan, A., *Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining*. *J Cell Biol*, 1975. **66**(1): p. 188-93.
24. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. *J Immunol Methods*, 1995. **184**(1): p. 39-51.
25. Vermes, I., C. Haanen, and C. Reutelingsperger, *Flow cytometry of apoptotic cell death*. *J Immunol Methods*, 2000. **243**(1-2): p. 167-90.
26. Olsson, M. and B. Zhivotovsky, *Caspases and cancer*. *Cell Death Differ*.
27. de Martimprey, H., et al., *siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(1): p. e2.
28. Thompson, A.D., et al., *Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(40): p. 5506-13.
29. Braunreiter, C.L., et al., *Expression of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's sarcoma*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(23): p. 2753-9.
30. Elhames, H., et al., *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles*. *Oligonucleotides*, 2009. **19**(3): p. 255-64.
31. Toub, N., et al., *Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma*. *Pharm Res*, 2006. **23**(5): p. 892-900.
32. Maksimenko, A., et al., *In vivo potentialities of EWS-Fli-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1058**: p. 52-61.
33. Maksimenko, A., et al., *Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **1002**: p. 72-7.
34. Yu, Y., et al., *A humanized anti-VEGF rabbit monoclonal antibody inhibits angiogenesis and blocks tumor growth in xenograft models*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9072.
35. Teicher, B.A., et al., *Characteristics of human Ewing/PNET sarcoma models*. *Ann Saudi Med*, 2011. **31**(2): p. 174-82.
36. Sainz-Jaspeado, M., et al., *Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(11): p. 1489-500.
37. Houghton, P.J., et al., *Evaluation of cytarabine against Ewing sarcoma xenografts by the pediatric preclinical testing program*. *Pediatr Blood Cancer*, 2010. **55**(6): p. 1224-6.
38. Martinez-Ramirez, A., et al., *Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003. **141**(2): p. 138-42.

39. Scotlandi, K., et al., *Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma*. J Orthop Res, 2000. **18**(6): p. 959-66.
40. Hu-Lieskovan, S., et al., *Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8984-92.
41. Smith, R., et al., *Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma*. Cancer Cell, 2006. **9**(5): p. 405-16.
42. Kowalewski, A.A., R.L. Randall, and S.L. Lessnick, *Cell Cycle Deregulation in Ewing's Sarcoma Pathogenesis*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 598704.
43. Malumbres, M., et al., *Cyclin-dependent kinases: a family portrait*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1275-6.
44. Mendelsohn, J.H., P.M. Israel, M. A. Gray, J. W and and T. B, *The Molecular Basis of Cancer*,. Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 3rd edition., 2008.
45. Zhang, J., et al., *Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6026-34.
46. Matsumoto, Y., et al., *Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes*. Br J Cancer, 2001. **84**(6): p. 768-75.
47. Sanchez, G., et al., *Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 6004-9.
48. Barros, L.F., T. Hermosilla, and J. Castro, *Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2001. **130**(3): p. 401-9.
49. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R., *Apoptosis: a basicbiological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer,, 1972. **26**: p. 239–257.
50. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.

Deuxième partie :

Mise au point et évaluation d'un
nanovecteur dirigé contre les cellules sur
sarcome d'Ewing

**siRNA associated with targeted nanoparticles directed against cd99
antigen improve gene expression inhibition *in vivo* in Ewing's
sarcoma.**

Ramon AL^{a,b,c,d}, Bertrand JR^{a,d}, de Martimprey H^{a,b,c,d}, Ponchel, G^{b,c} Malvy C^{a,d},
Vauthier C^{a,c}

a CNRS UMR 8203 Vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses, 114 rue
Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex

b Univ Paris-Sud, PhysicoChimie, Pharmacotechnie et biopharmacie, UMR CNRS
8612, F92296 Châtenay-Malabry

c CNRS, F- 92296 Châtenay-Malabry

d Univ Paris-Sud, F-94805 Villejuif

Corresponding author :

Christine Vauthier

Univ Paris Sud, Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie, UMR CNRS
8612

Rue J.B. Clément

F-92296 CHATENAY-MALABRY Cedex France

christine.vauthier@u-psud.fr

Phone: 33 1 46 83 56 03

Fax : 33 1 46 83 53 12

Abstract

Ewing sarcoma is a rare, mostly pediatric bone cancer which presents a chromosome abnormality, called EWS/Fli-1, responsible for the development of the tumours. *In vivo*, tumour growth can be inhibited specifically by delivering siRNA associated with nanoparticles. The aim of the work was to design targeted nanoparticles against the cell membrane glycoprotein cd99 which is over expressed in Ewing sarcoma cells in order to improve siRNA delivery to tumour cells. Biotinylated poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles were conceived as a platform to design targeted nanoparticles with biotinylated ligands and using the biotin-streptavidin coupling method. The targeted nanoparticles were validated *in vivo* for targeted delivery of siRNA after systemic administration to mice bearing a tumor model of the Ewing sarcoma. The expression of the gene responsible of Ewing sarcoma was inhibited at 86% by associating the siRNA with the cd99 targeted nanoparticles compared with 57% achieved with the non targeted nanoparticles.

1. Introduction

Ewing's sarcoma is a rare, mostly pediatric, bone cancer affecting mostly children and young adults before 20 years old. It is a very aggressive disease with low survival rates, around 63% for localized disease and 32% for metastatic disease at 10 years [5].

In 85% of the cases, it is associated with the t(11;22)(q24;q12) chromosomal translocation leading to the transduction of the EWS/Fli-1 fusion protein [24, 216]. This chromosomal abnormality is known to be responsible for Ewing's sarcoma features in various cell types [198, 217-218] and cell tumorigenicity in mice [219].

RNA interference (RNAi) mediated by small interfering RNAs (siRNAs) allows inhibiting a specific gene by targeting and degrading its mRNA sequence. Since their discovery in 2001, siRNAs have been studied as potential new therapeutic agents against cancer, including Ewing's sarcoma. Several siRNA sequences targeting the junction oncogene EWS/Fli-1 have been studied and were shown active both *in vitro* and *in vivo* [152, 158, 220-221]. As all oligonucleotides, siRNA are poorly stable in biological fluids. It is necessary to protect them to achieve successful *in vivo* delivery. To this aim, one of the strategies currently used is carrying siRNA using nanoparticles to protect and distribute them in the blood stream down to their target. Among all suggested nanocarriers, we described a successful *in vivo* delivery of siRNA with a polymeric carrier made of poly(isobutylcyanoacrylate) (PIBCA)/chitosan core/shell nanoparticles [170-171, 222]. Efficiency of those nanoparticles may further be improved by increasing their capacity to address specifically the siRNA to the target cells, *i.e.* the Ewing's sarcoma tumor cells. This would also reduce the siRNA doses needed for the treatment in human hence the cost and the possible adverse

effects. A targeting method could be based on the grafting of the anti-cd99 antibodies on the chitosan corona of the PIBCA nanoparticles. This antibody is specific to the cd99 which is a cell surface glycoprotein overexpressed in Ewing's sarcomas family tumor cells (ESFT) [67, 191]. Attachment of the antibodies on the nanoparticle surface can be achieved according to a method based on the formation of an avidin-biotin complex suggested by Segura-Sanchez *et al.* [223]. This approach allows flexibility in the choice of the antigen to be grafted onto the surface of the nanoparticles in the future. Thus the aim of the present work was to conceive immunonanoparticles using the chitosan-decorated PIBCA nanoparticle drug delivery platform and to evaluate their potential to improve *in vivo* delivery of siRNA in a human Ewing's sarcoma tumor xenografted to nude. Performance of the immunonanoparticles was compared with that of the non targeted nanoparticles.

2. Material and methods

2.1. Material

Pluronic[®] F68 (Lutrol F68) was provided by BASF (Germany). Chitosan middle-viscous was supplied by Fluka (Germany). Chitosan was hydrolyzed by the method previously used by Huang *et al.*[224] using 90 mg of NaNO₂ for 2 g of chitosan diluted in 100 mL of acetic acid 6%. The molecular weight of chitosan chain was 20.2 kDa as determined by capillary viscosimetry. All the experiments were conducted with the same batch of hydrolyzed chitosan in order to avoid any variability attributable to changes of the batch (e.g. changes in the polydispersity of the chitosan chains)

EZ-Link® TFP-PEO3-biotin, EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin, EZ-link® Biotin-LC-hydrazide and EZ-link® Biotin-PEG4-hydrazide were purchased from Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA. IsoButylCyanoAcrylate (IBCA) was provided by Henkel Biomedical, Ireland. The siRNA were purchased from Eurogentec (Brussels, Belgium). The sequence was chosen to be complementary to the EWS/Fli-1 fusion oncogene : sense strand : 5' GCAGCAGAACCCUUCUUAUd(GA) 3') and antisense strand : 3' d(CC)CGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'. The control sequence was: sense strand :5' – GCCAGUGUCACCGUCAAGGdAdG – 3' and antisense strand 5' – CCUUGACGGUGACACUGGC dTdT –3'. The siRNA were purchased from Eurogentec (Brussels, Belgium). Primers for RT-PCR experiment were purchased at Eurogentec (Belgium) with sequence: EWS -F 5'-AGC AGT TAC TCT CAG CAG AAC ACC-3'; Fli-1 -R 5'-CCA GGA TCT GAT ACG GAT CTG GCT G-3'; mcherry -R 5'TCA TCA CGC GCT CCA CTT GA-3'; mcherry-F "TCC GTG AAC GGC CAC GAG TT-3'.

2.2. Methods

2.2.1. Synthesis of PIBCA/Chitosan nanoparticles by Redox Radical Emulsion Polymerization

PIBCA/Chitosan nanoparticles were synthesized by redox radical emulsion polymerisation according to de Martimprey *et al.* [171]. The hydrolyzed chitosan (0,0688g) and 3.5 % of Lutrol F68 were dissolved in an aqueous solution of nitric acid (4 mL, 0.2 N) in a glass bottle at 42°C under strong magnetic stirring and argon bubbling. After 10 min, a solution of Cerium (IV) ammonium nitrate (1 mL, 80 mM in 0.2 N nitric acid) was added. Immediately after, 250 µL of IBCA were added under

vigorous stirring and argon bubbling was maintained for 10 min. The reaction was allowed to continue at 42°C for 50 min. After cooling in an ice bath for 5 min, the dispersion was dialysed (Spectra/Por membranes, MWCO: 100,000, Biovalley) four times for 30 min, 30 min, 1 h, 1 h and overnight against 1 L of MilliQ[®] water acidified with 1 mL of acetic acid 16 mM.

To label the core of the nanoparticles, 800 µL of a rhodamine labelled monomer, PolyFluor[®] 570 (methacryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (N-[9-(2-carboxy-x-methacryloxyethylthiolcarbamoyl-phenyl)-6-diethylamino-3H-xanthen-3-ylidene]-N-ethyl-ethanaminium chloride, Polyscience, BioValley, France) solution in acetonitrile (2 mg/mL) was added to the polymerization medium 2 min after the addition of the monomer [225].

2.2.2. Preparation of the immunonanoparticles

PIBCA/Chitosan nanoparticles were first diluted to 10 mg/mL in milliQ water. EZ-Link[®] TFP-PEO3-biotin or EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin were added at concentrations of 0.7 mmol/L and 1.4 mmol/L to the nanoparticle dispersion to achieve nanoparticle biotinylation and allow to react on a rotating wheel at room temperature for 2 h in the dark. Samples were dialyzed five times against sterile water (Spectra/Por membranes, MWCO: 100,000, Biovalley) for 30 min, 30 min, 1 h, 1 h and overnight to remove any excess of reactant.

For antibody biotinylation, antibodies were first oxidized using 250 nM sodium metaperiodate (Sigma-Aldrich, USA) in AcONa/AcOH 0.2 N, pH 5.5, 30 min, 4°C in the dark. After washings with reaction buffer, oxidized antibodies were coupled to biotin using EZ-link[®] Biotin-LC-hydrazide or EZ-link[®] Biotin-PEG4-hydrazide in various amounts.

To insure efficient coupling and avoid nanoparticle aggregation we chose to use a two step complex formation. First, biotinylated antibody were associated with an excess of neutravidin (NeutrAvidin Protein, Pierce Thermo Fisher Scientific, USA), during 2 h. After three washings with desalting columns (100 k centrifugal filter units, Millipore, USA) in order to remove the unreacted neutravidin, antibodies diluted in 50 μL of MilliQ[®] water were mixed with 50 μL of nanoparticles (10 mg/mL) and left overnight on a rotating wheel for equilibration.

2.2.3. Nanoparticle Characterization

2.2.3.1. Particle Size

The hydrodynamic diameter of the PIBCA/Chitosan nanoparticles was determined at 25°C by quasi-elastic light scattering with a Zetasizer 4 (Malvern Instrument Ltd, France), operating at 90°. 20 μL of each sample was diluted in 1 mL of MilliQ[®] water. The temperature was allowed to equilibrate 5 min before measurement. Results show the mean hydrodynamic diameter of the nanoparticles obtained from at least three measurements. The size experiments were performed on three independent batches of nanoparticles and three measurements were performed each time.

2.2.3.2. Zeta Potential

Zeta potential was measured using a Zetasizer 4 (Malvern Instrument Ltd, France). 80 μL of nanoparticle dispersion were diluted in 2 mL of NaCl 1 mM. The measurements were repeated at least three times.

2.2.3.3. Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed using a Philips EM208 with a large format CCD camera AMT at the CCME Orsay. The samples were diluted in MilliQ[®] water 1:100 and deposited on a carbon-coated formvar film on copper grids. After 5 min, the excess was removed and stained with neutral 1% aqueous phosphotungstic acid for 30 s.

2.2.3.4. siRNA labelling and adsorption onto nanoparticles

siRNA were labelled at 5' terminal end using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [γ -³²P]ATP (6000 mCi/mol) as indicated by the supplier. After 1 h incubation at 37°C, labelled siRNA were separated from unreacted material by gel filtration (Sephadex G25 Column) and centrifugation (1500 rpm/min). This filtration step also allows the removal of eventual small molecular weight impurities of the labelled siRNA.

Various amounts of PIBCA/Chitosan nanoparticles and siRNA were dissolved in a final volume of 300 μ L of water or HEPES buffer (10 mM HEPES pH 7.3, 100 mM NaCl) and briefly mixed. NP:siRNA or NP:ODN mass ratios ranged from 1:0 to 1:300. After 10 min of incubation, nanoparticles were ultracentrifuged (45 000 rpm, 1 h). After centrifugation, radioactivity was measured in supernatants. Each experiment was repeated three times independently on the same batch of nanoparticles.

2.2.3.5. Activation of the complement system

Activation of the complement system was evaluated using 2D immunoelectrophoresis as described previously [226-227]. Briefly, the nanoparticles

(400 cm² in 100 µL) were incubated with 50 µL of human serum and 50 µL Veronal buffer containing 0.15 mM calcium chloride and 0.5 mM magnesium chloride for 1 h at 37 °C. After incubation, 7 µL of each sample was migrated on a 1% agarose gel. Each strip of the first electrophoresis was migrated on Gelbond[®] films in 1% agarose gel plates with a human C3 polyclonal antibody (Goat complement C3 antiserum, Sigma, France), recognizing both C3 and C3b. The Gelbond[®] films were dried and stained with Coomassie blue to reveal the presence of C3 and C3b. The complement activation factor (CAF) was calculated from the ratio of the area of the peak attributed to C3b over the sum of the areas of the peaks attributed to C3b and to C3.

$$CAF = 100 \cdot \frac{C3b}{C3b + C3}$$

The CAF were determined using three independant experiments performed on the same batches of nanoparticles. For the nanoparticles carrying antibodies, the grafting of the antibodies was also done three independent times; each generated batch was evaluated separately.

2.2.4. Characterization of the functionality of the biotin grafted onto PIBCA/Chitosan nanoparticles and on the antibodies

Efficiency of the coupling reaction of the biotin spacer onto the PIBCA/Chitosan nanoparticles was determined using HABA/Avidin colorimetric reaction (HABA/Avidin reagent, Sigma-Aldrich, USA). Control sample was the unbiotinylated PIBCA/Chitosan nanoparticles.

To check the coupling efficiency of the biotine on the antibodies, we used flow cytometry with streptavidin-FITC (Streptavidin–FITC from Streptomyces avidinii, Sigma-Aldrich, USA) as a revelation agent or TEM using gold-avidin

(Streptavidin–Gold from Streptomyces avidinii, Sigma-Aldrich, USA) as a revelation agent.

Flow cytometry was performed as follow. First, a suspension of cd99-expressing jurkat cells at a concentration of 2.5×10^6 cells/mL was prepared. 200 μ L of the cell suspension (5,100 cells) were plated in a 96-well plate, centrifuged and the pellet was rinsed twice with cold PBS buffer to remove the culture medium. After centrifugation at 4°C, cells were suspended in 20 μ L of cold PBS buffer containing 0.5 μ g of biotinylated cd99 antibody and incubated on ice at 4°C during 1 h. Cells were then rinsed twice with 200 μ L of cold PBS buffer and centrifuged at 4°C. The resulting pellet was resuspended in 20 μ L of cold PBS buffer containing 4 μ g of streptavidin-FITC as a revelation agent and incubated another hour in the dark on ice at 4°C. After 2 more washings with 200 μ L ice cold PBS, samples were suspended in 200 μ L of ice cold PBS and analyzed using a flow cytometer (FACS Calibur, BD Biosciences, USA).

2.2.5. Characterization of the immunonanoparticles: Biotin-avidin specific recognition

To assess the efficiency of the coupling reaction of the antibodies through the specific biotin-avidin sandwich, we used both western blotting technique and bichromic acid (BCA) dosage.

For both experiments, an aliquot of coupled nanoparticles were centrifugated and 10 μ L of the supernatant was used for SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) analysis or BCA testing.

For western blotting, samples were boiled at 95°C with Nu PAGE[®] sample Buffer 4x and Nu PAGE[®] reducing agent during 5 min. Then samples were loaded on precast

12% polyacrylamide gels (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) and migrated at 200 volts for 50 min. The proteins were transferred on a nitrocellulose membrane using semi dry tranfert for 1 h 30 at 25 V. The membrane was blocked in 5% non fat milk in PBS-Tween (0.1%) for 1 h. Then the membrane was incubated overnight at 4°C with a goat anti-human antibody coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch, USA) diluted to 1/500. Proteins were visualized with an enhanced chemoluminescent (ECL) system (GE Healthcare, UK).

For BCA, 10 µL samples were mixed with 10 µL of reconstituted BCA reagent (Pierce BCA Assay kit, Pierce) and incubated for 1 h at 37°C in the dark. Optic density (OD) at 562 nm of the samples was measured using a 96-well plate reader as indicated by the manufacturer (MRX II & MRX Model 96 Well Plate Reader, Dynex). The concentration of the antibodies retrieved in the supernatant was determined by comparing the OD of the sample to a standard curve as advised by the manufacturer of the BCA dosage kit.

2.2.6. Evaluation of the cytotoxicity of the nanoparticles

For toxicity studies, A673 cells from a patient an Ewing's sarcoma tumor were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) with glutamax (Gibco) containing 10% of heat-inactivated bovine foetal serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 U/mL). Cultured cells were regularly tested for the presence of mycoplasma with MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Basel, Switzerland). Cells were plated in 96-well plate at 104 cells per well and cultivated for 24 h at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. After 24 h, cell medium was removed and replaced by a dispersion of nanoparticles in culture medium, concentrations ranging from 0 to 1000 µg/mL. The cells were allowed to grow for 24 h. Then the culture medium was

replaced by 100 μ L of a solution of dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/mL in PBS) and incubated at 37°C for 3 h. After incubation, 100 μ L of 10 mM hydrochloric acid/10% sodium dodecyl sulphate solution was added to each well and allowed to solubilise formazan crystals overnight. Each plate was read on a microplate reader (MRXII, Dynex Technology) at a wavelength of 570 nm. Untreated cells were used as control. Each nanoparticle concentration was evaluated three independent times (one batch per type of nanoparticles), and each measurement was made in triplicate.

2.2.7. Characterization of the expression of the glycoprotein cd99 expression on the Ewing sarcoma cell lines

To assess cd99 expression in our laboratory cell lines, 5×10^5 A673, TC71 or Jurkat cells were incubated with 0,5 μ g of cd99 antibody, 1 h, 4°C on ice in dark. After three PBS washing, cd99 recognition was revealed using a FITC-anti mouse antibody (0.5 μ g), 1 h, 4°C on ice in dark. Staining was revealed using flow cytometry (BD FACSCalibur, BD biosciences, USA).

2.2.8. Efficient recognition of the cd99 membrane protein by the immunonanoparticles

For confocal microscopy, A673 cells were plated on cover glasses in 6-Well plates and allowed to grow for 24 h cultured in complete medium. After 24 h the culture medium was removed and replaced by OptiMEM for 30 min at 4°C on ice. Then OptiMEM was removed and replaced by OptiMEM containing Rhodamine labeled nanoparticles. The cells were incubated 30 min at 4°C on ice, then rinsed three times

with cold PBS and fixed with cold paraformaldehyde 4 %. Cover-glasses were mounted using 10 μ L of Dapi-Fluoromount prior to the observation with a confocal microscope SPE Leica (Leica Microsystems GmbH, Germany) from the microscopy platform of the Institut Gustave Roussy.

2.3. *In vivo* efficiency of the immunonanoparticles

All the animal experiments were performed under the French laws on animal experimentation and the protocols were approved by the ethic committee on animal experimentation of the Institut Gustave Roussy.

2.3.1. Tumor growth inhibition

Nude mice were injected subcutaneously in the left flank with A673 cells (2.5×10^6 cells/mouse). 50 mm³ tumor-bearing nude mice (about 30 g weight) were treated by intravenous injections (tail vein) of siRNA associated with PIBCA/Chitosan nanoparticles at two cumulated dose levels (7 mg/kg and 336 μ g/kg siRNA total dose, divided in five injections, each injection having a final volume of 100 μ L/mouse) in order to determine the lowest efficient dose and the existence of a dose-effect. Tumor size was evaluated up to 24 days after the first day of treatment using an electronic caliper.

2.3.2. Measurement of EWS/Fli-1 inhibition

Nude mice were injected subcutaneously in the left flank with A673 cells (2.5×10^6 cells/mouse). Tumor-bearing nude mice (about 30 g weight) were treated by intravenous injections of siRNA associated or not with the PIBCA/Chitosan

nanoparticles or with the immunonanoparticles. All the nanoparticles used were dispersed in a 0.9% saline solution. The total cumulative dose of siRNA injected was 120 µg/kg divided in 5 injections of 24 µg/kg diluted in a volume of 100 µL per injection. Control experiments were performed using physiological serum (0.9% saline solution), as well as free siRNA at the same dose (120 µg/kg cumulative dose) or empty nanoparticles dispersed in physiological serum at concentrations used in the experiments performed with the siRNA loaded nanoparticles. The injections were performed at day 0, 2, 4, 6, 8 in the caudal vein. Mice were sacrificed 24 h after the last injection. Tumours were conserved in TRIzol (Invitrogen, USA). RNA was extracted from tumours in TRIzol as indicated by the supplier. Resulting ARN samples were used to perform Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). For total RNA extraction tumor samples were lyzed with 800 µL TRIzol. 160 µL of chloroform were added, and the mixture was centrifugated at 13 000 rpm for 15 min. Then, 350 µL of the resulting aqueous phase were mixed with the same volume of isopropanol, incubated for 15 min at room temperature and centrifuged at 13 000 rpm for 15 min at 4°C. The pellet was washed twice using 70 % ethanol, let to dry and dissolved in 100 µL of water containing 0.5 unit/µL of RNasin ribonuclease inhibitor (Promega Corp., USA). Total RNA was quantified (260nm) using the ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop, USA). Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA by adding 2 µL of Random Hexamers at 50 µg/µL (Promega), and heated at 65 ° C during 5 min. Then RNA was incubated with 0.5 µL of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) 200 unit/µL, 0.5 µL of dNTP 20 mM, 0.5 µL of RNasin 40 unit/µL and 4 µL of M-MLV RT 5X reaction buffer (Promega) for 1 h at 42°C.

Quantitative PCR (qPCR) was performed using SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) using 5 µL of cDNA diluted to 1/20 (v/v) in 25 µL final volume. Samples were amplified with 45 cycles using a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) as follows: 2 min incubation at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C over 15 s and 60°C over 1 min. The results are expressed in percentage compared to untreated tumor samples.

2.4. General *in vivo* tolerance of the nanoparticles

Mice were weighted every day during the experiment to check for toxicity. Immediately before sacrifice blood was collected from mice for further analysis by intracardiac puncture under isoflurane anaesthesia. Blood was used for complete blood count, Aspartate amino transferase (AST)/Alanine Amino transferase (ALT) measurement and urea/creatinin measurement. AST/ALT are commonly used to monitor liver function while urea and creatinin are commonly used to monitor kidney fonction.

3. Results

3.1. Preparation of the immunonanoparticles

The preparation of the immunonanoparticles was performed in 3 steps according to the method proposed by Segura-Sanchez *et al.* [20]. At first, a biotinylated spacer was grafted on the nanoparticle corona. Another biotinylated spacer was coupled on the previously oxidized primary alcohol functions on the Fc fragment of an anti-cd99 antibody. The biotinylated antibodies and the biotinylated nanoparticles were

assembled using neutravidin to form the immunonanoparticles directed against the cd99 surface glycoprotein expressed at the surface of the targeted cells. The assembly was formed due to the strong affinity of biotin for avidin which is known for a long time [228].

3.1.1. Nanoparticle biotinylation

The EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (1,2) did not allow to link biotin motifs to the surface of the nanoparticles. In contrast, EZ-Link[®] TFP-PEO3-biotin (3,4,5) allowed an efficient attachment of the biotin onto the surface of the nanoparticles (Table1).

N°	Composition of the shell	Lutrol F68 (%)	Initial biotin concentration mmol/mL	Remaining biotin mmol/mL	Number of biotin by NP
1	Chitosan 70kDa	2	0.7	0	0
2	Chitosan 70kDa	2	1.4	0	0
3	Chitosan 70kDa	2	0.7	$4.68 \cdot 10^{-7}$	7
4	Chitosan 70kDa	2	1.4	$1.78 \cdot 10^{-6}$	25
5	Chitosan 20kDa	3.5	1.4	$1.53 \cdot 10^{-6}$	43±7

Table 1: Biotinylation of PIBCA/MethylMethaAcrylate Rhodamine nanoparticles using two different biotinylated spacers. i stands for initial and f stands for final.

EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (1,2), EZ-Link[®] TFP-PEO3-biotin (3,4,5).

At a concentration of 1.4 mM, this spacer allowed to link up to 43 biotins per nanoparticle with a final concentration of biotin up to $1.53 \cdot 10^{-6}$ mmol/ml at a

concentration in nanoparticles of 10 mg/mL. The grafting was confirmed by TEM with gold labeled avidine molecules as a revelation agent. No labeling could be seen on particles grafted with the EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (Figure 1 images 1 and 2). In contrast, with EZ-Link[®] TFP-PEO3-biotin (Figure 1 images 3 and 4), TEM showed black dots at the surface the biotinylated nanoparticles corresponding to the gold avidin linked to the biotin motives.

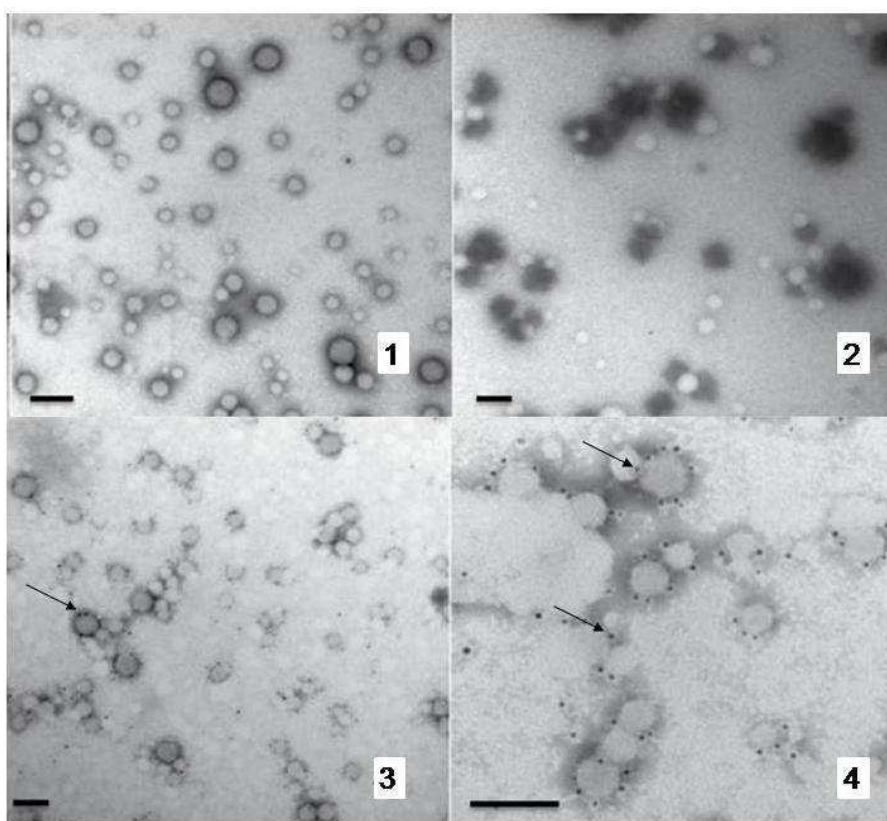


Figure 1: Transmission Electron Microscopy of nanoparticles modified by grafting biotin on their surface with the EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (1, 2) and the EZ-Link[®] TFP-PEO3-biotin (3,4) reagents. The presence of biotin residues on the nanoparticles surface was revealed using gold-Avidin. Scale bar = 100nm.

3.1.2. Biotinylation of the anti-cd99 antibody

Figure 2 shows flow cytometry analysis of untreated A673 cells (A), A673 cells incubated with control biotinylated antibody (B) and cd99 biotinylated antibody (C) revealed using FITC-avidin. There were no detectable fluorescent cells for untreated cells or cells treated with control biotinylated antibody. However, cells treated with cd99 biotinylated antibody demonstrated a green fluorescence peak. This demonstrated that cd99 antibodies were biotinylated and that the biotin motif was still accessible for complexation with avidin. Moreover, this also showed that the biotinylation did not affect the ability of the cd99 antibodies to bind their glycoprotein target on cell membranes.

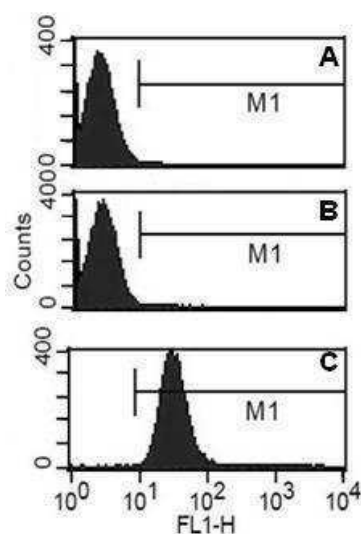


Figure 2: Flow cytometry analysis performed on A673 cells to evaluate the binding capacity and specificity of the anti-cd99 antibody to their targeted cells after biotinylation. Revelation of the antibody binding to the A763 cells was achieved using a fluorescein labeled streptavidin. Flow charts from A: Untreated cells; B: cells incubated with biotinylated control antibody; C: cells incubated with biotinylated anti-cd99 antibody.

3.1.3. Evaluation of the coupling efficiency of the biotinylated antibody and of the PIBCA/chitosan nanoparticles

Targeted nanoparticles were formed by the assembly of biotinylated cd99 antibody with biotinylated nanoparticles using avidin due to the formation of biotin-avidin complexes. The ability of the biotin-avidin complex to efficiently bind antibodies on the surface of nanoparticles was verified using bichromic acid (BCA) dosage, a colorimetric method used to measure protein concentration, and western blotting, a method used to reveal the presence of specific proteins in a sample.

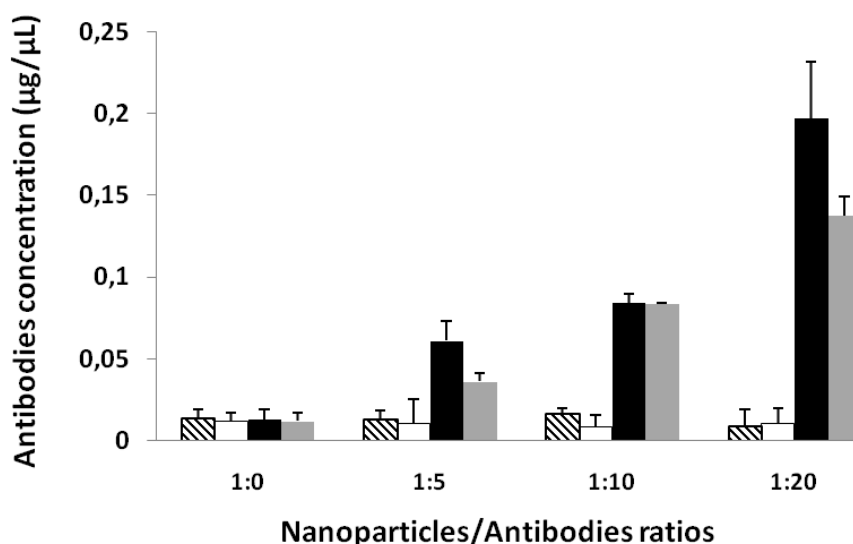


Figure 3: BCA dosage of the remaining free antibodies found in biotinylated nanoparticle dispersions after incubation with or without avidin at different ratios. Theoretical ratio of the number of nanoparticles over the number of antibody molecules were: 1:0, 1:5, 1:10, 1:20. Hashed bars: biotinylated nanoparticles + avidin + biotinylated anti-cd99 antibody, white bars: biotinylated nanoparticles + avidin + biotinylated control antibody, black bars: biotinylated nanoparticles + biotinylated anti-cd99 antibody, grey bars: biotinylated nanoparticles + biotinylated control antibody

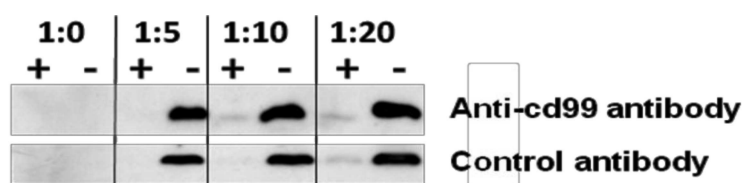


Figure 4: Western blot analysis of supernatants recovered from coupled and uncoupled nanoparticles showing the light fragment of the antibodies. + : with avidin. - : without avidin. The ratios: 1:0, 1:5, 1:10, 1:20 were the theoretical ratio number of nanoparticles over the number of antibody molecules.

As shown in figures 3 and 4, there were no remaining free antibodies when the nanoparticles were incubated in the presence of avidin. On the contrary, without avidin, we showed that remaining free antibodies were detected. Moreover, the amount of free antibodies detected in the nanoparticle dispersion corresponded to the initial quantity of antibodies used to prepare the nanoparticles. This indicated that there was no non - specific binding of the antibodies on the cationic shell of the nanoparticles and that antibodies associated with the nanoparticles were only those coupled via the biotin-avidin grafted method used in the coupling procedure. Addition of avidin in media containing both the biotinylated antibody and the biotinylated nanoparticles allowed the formation of the immunonanoparticles.

3.2. Characterisation of the nanoparticles

3.2.1. Size

The mean size of the nanoparticles was not significantly modified after biotinylation and after grafting of the antibodies, regardless of the amount of antibody added at

the surface of the nanoparticles (table 2). These results indicated that the size of the nanoparticles remained stable after biotinylation and after association of the antibody to form the immunonanoparticles.

	Mean size $\pm$ SD (nm)	CAF $\pm$ SD (%)
PIBCA/Chitosan	66 $\pm$ 3	20 $\pm$ 9
PIBCA/MMA-Rh/Chitosan, siRNA (ratio 50)	-	14 $\pm$ 2
PIBCA/MMA-Rh/Chitosan	80 $\pm$ 2	17 $\pm$ 5
Biotinylated PIBCA/MMA-Rh/Chitosan	82 $\pm$ 4	14 $\pm$ 4
PIBCA/MMA-Rh/Chitosan:Ab, 1:5	82 $\pm$ 4	24 $\pm$ 2
PIBCA/MMA-Rh/Chitosan:Ab, 1:10	84 $\pm$ 3	25 $\pm$ 3
PIBCA/MMA-Rh/Chitosan:Ab, 1:20	85 $\pm$ 4	22 $\pm$ 4
Negative control (VBS ²⁺)	-	13 $\pm$ 5
Positive control	-	91 $\pm$ 12

Table 2: Size of the nanoparticles and complement activation triggered by the various types of PIBCA/Chitosan nanoparticles considered in this work (n = 3). Ab: anti-cd99 antibodies. Theoretical ratio number of nanoparticles/antibody molecules. 1:5, 1:10, 1:20: siRNA:small interfering RNA ratio, PIBCA/MMA-Rh/Chitosan: rhodamine-labelled nanoparticles.

3.2.2. Morphology

Transmission electron microscopy (TEM) showed no differences in distribution, shape or size between PIBCA/MMA-Rhodamine nanoparticles and any of the PIBCA/MMA-Rhodamine nanoparticles grafted with various amounts of

avidin/antibody complexes (figure 5). However, immunonanoparticles with a number of grafting antibody molecules above 5 seemed to form aggregates during samples preparation for TEM observation.

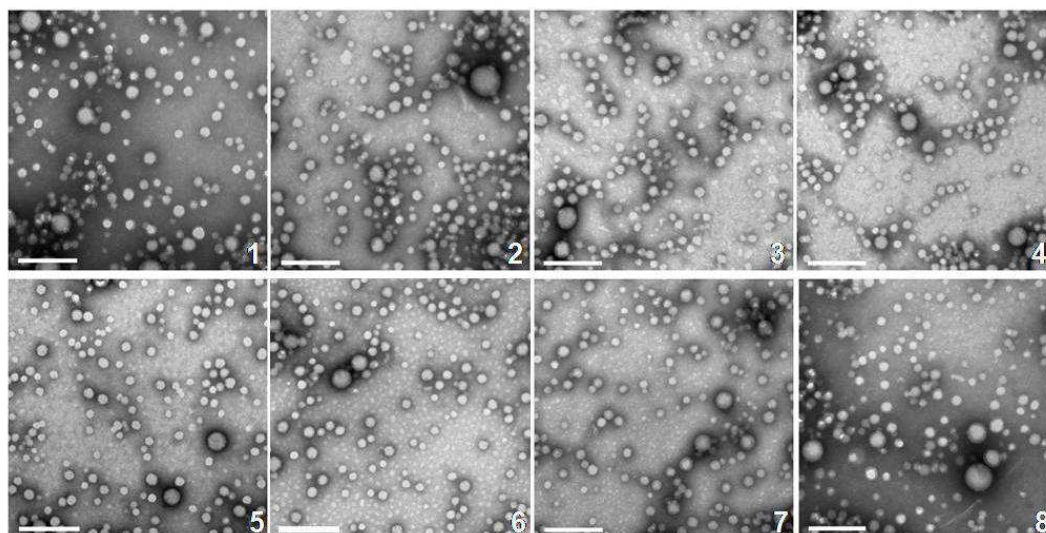


Figure 5: Transmission Electron Microscopy of targeted nanoparticles. Top line: NP carrying cd99 antibody, bottom line: NP carrying control antibody. Theoretical ratio of number of nanoparticles over the number of antibody molecules were: 1:0 (1,5), 1:5 (2,6), 1:10 (3,4), 1:20 (4,8). Scale bar: 200 nm

3.3. *In vitro* evaluation of the nanoparticles

3.3.1. Adsorption of siRNA onto nanoparticles

Capacity of biotinylated nanoparticles to adsorb siRNA was verified by performing adsorption experiments with a radiolabelled siRNA.

Figure 6 shows that, in MilliQ[®] water, the maximum amount of siRNA adsorbed on the biotinylated nanoparticles was decreased by 13.6 % at a nanoparticle/siRNA mass ratio of 50, compared with the non biotinylated nanoparticles. The decrease

was equal to 9.5 % at a nanoparticle/siRNA mass ratio of 300. This was correlated with the decrease of the zeta potential when comparing non modified nanoparticles (32 ± 3 mV) with biotinylated nanoparticles (24 ± 3 mV).

In saline medium, the difference between biotinylated and non biotinylated nanoparticles was not significantly different at a nanoparticle/siRNA mass ratio of 50, which was the ratio used for further *in vitro* and *in vivo* experiments.

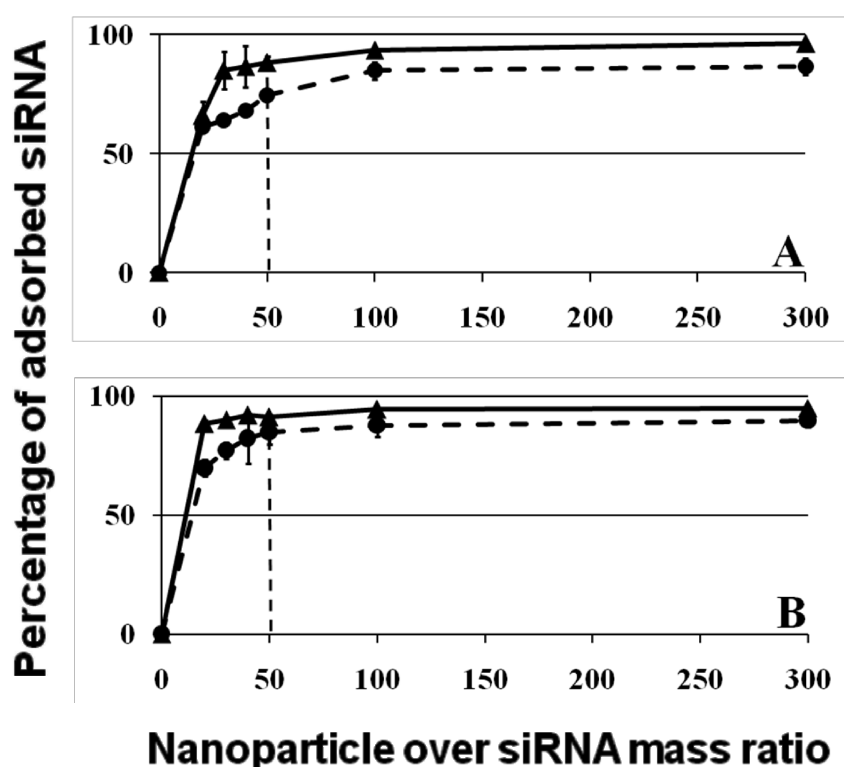


Figure 6: Adsorption of siRNA on nanoparticles. in MilliQ[®] water (A) and in HEPES/NaCl (B). Non modified nanoparticles (full triangles) and biotinylated nanoparticles (full circles).

3.3.2. Activation of the complement system

Results from the evaluation of the capacity of the nanoparticles to activate the complement system showed that none of the tested nanoparticles led to a complete

activation (Table 2). Complement activation factors (CAF) measured for the nanoparticles ranged from $14 \pm 4 \%$ to $23 \pm 3 \%$ while a positive control of activating nanoparticles showed a CAF of $91 \pm 12 \%$ and the spontaneous activation measured in the experimental conditions showed a CAF of $13 \pm 5 \%$. This indicated that the nanoparticles considered in this work were almost not activating regarding the complement cascade even after modification of their surface by adding biotine, the antibody and the siRNA or by labeling the core of the nanoparticles with a fluorescent molecule.

3.3.3. Evaluation of the cytotoxicity of nanoparticles

The average 50 % growth Inhibitory Concentration (IC_{50}) of the nanoparticles after 24h of contact in A673 cells was evaluated. The PIBCA/ Chitosan nanoparticles showed an IC_{50} of $32 \pm 3 \mu\text{g/mL}$. The tolerance of the nanoparticles by cells was decreased when the core was labeled using MethylMetaAcrylate Rhodamine as the IC_{50} dropped to $18 \pm 2 \mu\text{g/mL}$. However, the grafting of biotin and of the entire antibody-avidin complex did not decrease further the tolerance on A673 cells. Values of the IC_{50} were respectively $16 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ and $15 \pm 1 \mu\text{g/mL}$. Cytotoxicity of various IBCA nanoparticles evaluated by Chauvierre *et al.* ranged from $1 \mu\text{g/mL}$ to $120 \mu\text{g/mL}$ with a value for nanoparticles of IBCA/Dextran obtained by redox radical emulsion polymerization of $20 \mu\text{g/mL}$, which is a similar value to what we obtained in this study [222].

3.3.4. Evaluation of the Cd99 expression on different Ewing sarcoma cell lines

Figure 7 shows flow cytometry analysis of various cell lines obtained after labeling cells with anti-cd99 antibody or with a control antibody.

A673 (A), TC71 (B) and cd99 expressing Jurkat (C) cells show a shift of the fluorescence mean when incubated with the anti-cd99 antibody. On the contrary, cells which do not express cd99 (D) did not give any shift of the fluorescence mean. This indicated that Ewing's sarcoma cells lines A673 and TC71 were expressing the cd99 antigen. They can be used in the evaluation of a drug targeting strategy including the cd99 glycoprotein as the target.

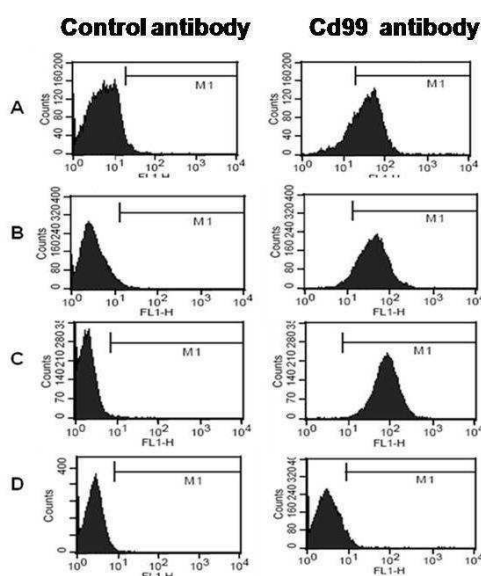


Figure 7: Evaluation of the cd99 expression on various cell lines. A: A673 cells, B: TC71 cells, C: cd99 positive Jurkat cells, D: cd99 negative Jurkat cells. Cells were first incubated with either a control antibody (left column) or the anti-cd99 antibody (right column) and revealed using an FITC coupled secondary antibody.

3.3.5. Confocal microscopy analysis

Confocal microscopy images of A673 Ewing's Sarcoma cell line treated with nanoparticles grafted with cd99 antibody or control antibody show that only nanoparticles carrying five units of the cd99 antibodies by nanoparticle could efficiently bind to the cell membrane with high specificity of the recognition (figure 8). The recognition of cd99 by the targeted nanoparticles was shown by the red labeling of the cell membrane, due to the rhodamin core of the nanoparticles. To localize cells position on the slide, the nucleus was stained with DAPI which appeared as a blue fluorescence.

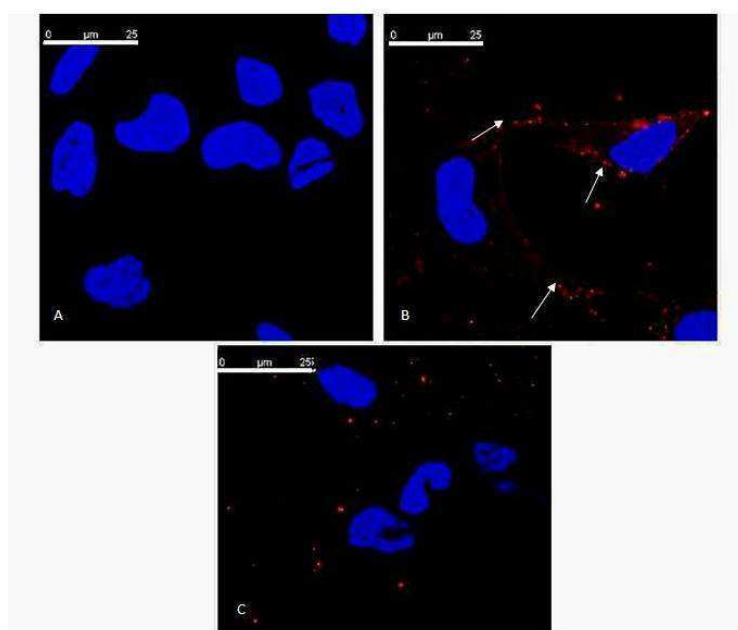


Figure 8 : Confocal micrographs of cd99 expressing A673 cells untreated (A), treated with cd99 targeted nanoparticles (ratio 1:5) (B) and treated with the non modified nanoparticles used as control nanoparticles (ratio 1:5) (C) The nanoparticles (red fluorescence shown by the white arrows) were labelled in the core with a rhodamine containing fluorescent probe. Cells nuclei were stained with Dapi (blue fluorescence). Scale bars: 25 µm.

3.4. *In vivo* evaluation of the nanoparticles

3.4.1. *In vivo* efficacy of the nanoparticles to target siRNA against Ewing's sarcoma tumors xenografted in mice

Expression of EWS/Fli-1 was evaluated by qRT-PCR after injection of different formulations and control samples in nude mice (figure 9). The level of expression of the gene was compared to that found in untreated mice. Nanoparticles carrying the siRNA not decorated with the antibody showed an inhibition of 56 ± 6 % after injection of a dose of 120 μg of siRNA/kg. Using the same dose of siRNA, the cd99 targeted nanoparticles inhibited the expression of EWS/Fli-1 at a much higher level 84 ± 4 %. All control experiments including mice treated with siRNA alone or with nanoparticles alone or nanoparticles carrying control siRNA did not show any significant inhibition of the expression of EWS/Fli-1 gene. The 20-30% inhibition observed in those samples is statistically insignificant and commonly found in q-RT-PCR experiments. The inhibition of EWS/Fli-1 by nanoparticles carrying the siRNA EWS/Fli-1 is 29.8% higher than the inhibition of EWS/Fli-1 by nanoparticles carrying the control siRNA and the inhibition of EWS/Fli-1 by the targeted nanoparticles carrying the siRNA EWS/Fli-1 is 76.6% higher than the inhibition of EWS/Fli-1 by nanoparticles carrying the control.

After 24 days of treatment with IV injected siRNA associated with untargeted nanoparticles (2.5 mg/kg), a significant difference in tumour growth was observed between untreated (relative tumor volume of 12 ± 4 , n=11) and treated (relative tumor volume of 9 ± 2 , n=4) animals ($p < 0.005$, Mann & Whitney).

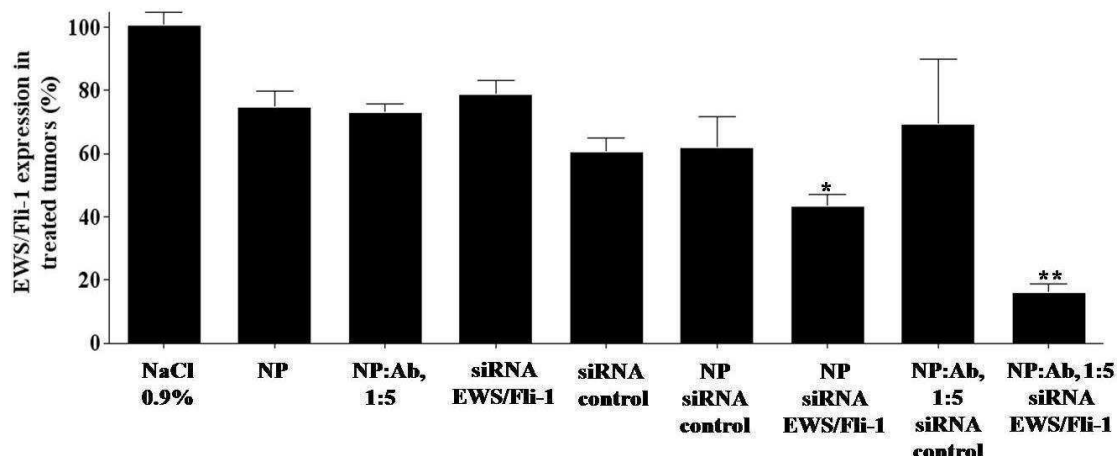


Figure 9: Evaluation of the *in vivo* efficiency of the siRNA loaded nanoparticles. The expression of EWS/Fli 1 gene was measured by RT-qPCR. Results were expressed as a percentage of the level of expression found in the tumour of untreated mice. NP: Nanoparticles; Ab: cd99 Antibody. Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Kruskal-Wallis test.

3.4.2. *In vivo* toxicity of the nanoparticles

Figure 11 and table 3 summarize results of the tolerance study of the treatments. No variation in the weight of mice was observed during treatment (figure 11). Blood parameters were not affected by treatments as indicated by no significant difference between the control group and the different treated groups neither in cell counts nor in parameters related to the renal function (urea, creatinin) and to the liver function (AST, ALT) (Table 3).

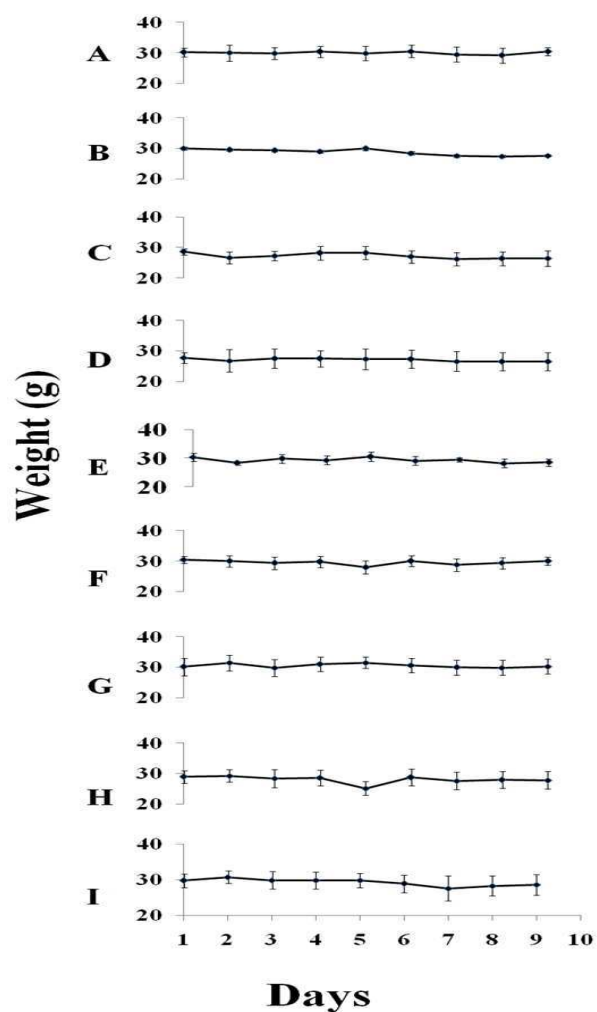


Figure 11: Evaluation of the nanoparticles general tolerance after intravenous administration by the measurement of the body weight over the duration of the treatment. NP: Nanoparticles; Ab: cd99 antibody

A : NaCl 0.9%, B: NP, C: NP:Ab, 1:5, D: siRNA control , E: siRNA EWS/Fli-1, F: NP siRNA control , G: NP siRNA EWS/Fli-1, H: NP:Ab, 1:5 siRNA control, I: NP:Ab, 1:5 siRNA EWS/Fli-1

	NaCl 0.9%	NP	NP-Ab, 1:5	siRNA EWS/Fli-1	siRNA control	NP siRNA Control	NP siRNA EWS/Fli-1	NP-Ab, 1:5 siRNA Control	NP-Ab, 1:5 siRNA EWS/Fli-1
Immune cells (m/mm ³)	4 ± 1	5 ± 2	4 ± 2	4 ± 2	7 ± 2	3 ± 2	3 ± 1	3 ± 2	4 ± 1
Erythrocytes (m/mm ³)	8.1 ± 0.6	8 ± 1	7 ± 1	9.4 ± 0.6	8 ± 2	9.2 ± 0.7	7 ± 3	7.9 ± 0.6	7.5 ± 0.7
Mean Cell Volume (fl)	56.3 ± 0.9	55 ± 2	55 ± 3	56 ± 1	56.0 ± 0.4	57 ± 1	56.1 ± 0.8	55.8 ± 0.6	56.6 ± 0.9
Hematocrite (%)	46 ± 4	52 ± 3	41 ± 8	53 ± 5	58 ± 8	52 ± 4	35 ± 7	44 ± 3	42 ± 5
Platelets (m/mm ³)	771 ± 225	746 ± 549	779 ± 486	917 ± 547	687 ± 350	614 ± 213	667 ± 462	422 ± 242	653 ± 484
Urea (mM)	9 ± 2	10 ± 2	9 ± 1	9 ± 1	8.1 ± 0.3	10 ± 2	9 ± 2	10.1 ± 0.6	8 ± 1
Creatinine (µM)	22 ± 6	17 ± 3	18 ± 7	24 ± 8	28 ± 15	26 ± 8	26 ± 8	18 ± 6	26 ± 4
ALT (IU/L)	62 ± 14	51 ± 10	53 ± 17	54 ± 8	49 ± 37	44 ± 3	51.5 ± 0.7	62 ± 1	53 ± 7
AST (IU/L)	795 ± 455	869 ± 224	994 ± 127	942 ± 310	930 ± 139	924 ± 154	1158 ± 124	702 ± 52	687 ± 221

Table 3: General *in vivo* tolerance of mice treatments. Evaluation of blood parameters. NP: Nanoparticles; Ab : anti-cd99 antibody; ALT: Alanine aminotransferase; AST : Aspartate aminotransferase.

4. Discussion

siRNA are promising candidates for cancer treatment, especially in diseases such as Ewing sarcoma which present a molecular abnormality allowing to target specifically the cancerous cells. However, these therapeutic molecules are fragile and rapidly degrade in the blood stream. Moreover, they cannot pass biological barriers, including cell membranes, due to their hydrophilic nature.

That is the reason why many attempts are made to carry those molecules to the tumors to improve their efficacy. Here we chose to use biocompatible polymeric nanocarriers that were previously applied with success in thyroid papillary carcinoma with siRNA [170-171]. In order to increase the targeting specificity of the nanoparticles and to decrease the required dose *in vivo*, we chose to address them by coupling an antibody directed against cd99. The antigen cd99, is well known. It is very often expressed in Ewing's sarcoma and is commonly used as a diagnosis marker [67, 191]. As shown in the present study, the cell lines A673 and TC71 expressed cd99 (Figure 7). So these cell lines were suitable to study nanoparticles targeted against Ewing's Sarcoma tumours.

In this study we showed an efficient biotinylation of the cd99 antibody and an efficient biotinylation of the nanoparticle surface (Figure 3). Association between both the biotinylated antibodies and the biotinylated nanoparticles lead to the formation of cd99 grafted nanoparticles thanks to the formation of biotin/avidin complexes. Transmission electron microscopy did not show any morphological difference between modified and unmodified nanoparticles indicating that the nanoparticles remained stable after surface modifications (Figure 5).

As the aim of this study was to design efficient and safe nanoparticles, we evaluated the ability of the nanoparticles to carry the siRNA directed against EWS/Fli-1 *in vivo*. Regarding association of siRNA with nanoparticles, no significant difference was observed between the adsorption of siRNA onto PIBCA/Chitosan nanoparticles and onto biotinylated PIBCA/Chitosan nanoparticles (Figure 6). Thus, the biotinylated nanoparticles were good candidates as nanocarriers for *in vivo* delivery of siRNA. Additionally, the toxicity of the nanoparticles was not influenced by both the biotinylation and the coupling of the surface antibodies. However, the nature of polymer composing the core seemed more critical as the introduction of methylmethacrylate decreased the IC₅₀ on A673 cells in culture by almost 58%.

Despite the amounts of biotin, avidin and antibodies found on the nanoparticle surface, the surface modified nanoparticles did not activate the complement system which is part of the immune system of the host (Table 3). Therefore, they were expected to keep the stealth characteristics brought by the chitosan-pluronic corona.

In vitro, confocal microscopy analysis of A673 cells treated with cd99-Rhodamine-nanoparticles or with control-rhodamine-nanoparticle showed (Figure 9) a red labelling of the cell membrane with the targeted nanoparticles that can't be seen with untargeted-rhodamine-nanoparticles or control-rhodamine-nanoparticles. *In vivo*, preliminary results (data not shown) indicated that accumulation of the nanoparticles into the tumor was more important and more rapid using nanoparticles grafted with cd99 antibody than untargeted nanoparticles. This was a promising result on the fact that the targeting of the nanoparticle induced a more efficient *in vivo* uptake thanks to recognition of the cd99 cell membrane glycoprotein target.

We evaluated the ability of a siRNA associated with the targeted nanoparticles to inhibit expression of EWS/Fli-1, which is considered to be the main genetic cause of

Ewing's sarcoma [24, 216]. After retrieving treated tumours, RT- qPCR experiment was carried out. Results show (Figure 9) a better inhibition of EWS/Fli-1 in tumours when the siRNA was administered using the cd99-targeted nanoparticles, probably due to a larger amount of siRNA delivered to the tumour compared with untargeted nanoparticles. At 24 days after treatment with untargeted nanoparticles, there was a significant decrease in the tumour growth in treated tumours compared to untreated tumours. This was consistent with results previously obtained *in vivo* with other types of nanoparticles delivering antisense oligonucleotides on murine cells expressing the human oncogene EWS/Fli-1 [123]. The *in vivo* role of EWS/Fli-1 in the tumor growth is still poorly understood. Our results show that if EWS/Fli-1 is really validated as an oncogenic target it is possible to modulate it in a system mimicking a therapeutic treatment (ie when the drug is administered once the tumor is already present). More *in vivo* investigations should be performed. However the fact that at 24 days after treatment with untargeted nanoparticles, there was a significant decrease of the tumor growth in treated tumors compared to untreated tumors, indicates that it is possible to obtain a human tumor growth inhibition by EWS/Fli-1 modulation induced by a siRNA. We had already obtained a similar result *in vivo* with a siRNA on a tumor formed from xenografted murine cells expressing the human EWS/Fli-1 [152].

It is noteworthy that the xenografted tumour considered in the present work was composed of human cells originating from an Ewing's sarcoma. This model was more relevant compared with a murine model of tumour to evaluate the efficacy of the therapeutic approach in the view of developing a treatment for human.

5. Conclusion:

In this work, we have developed biotinylated nanoparticles to be used as a new platform to design targeted polymeric nanoparticles with biotinylated ligands through a biotin-avidin coupling method. The approach was validated with targeted nanoparticles directed against cd99, well known as a diagnosis marker in Ewing's sarcomas. Those nanoparticles demonstrated their safety *in vitro* and *in vivo*. After i.v. injection siRNA carried by the targeted nanoparticles were able to inhibit the expression of the gene responsible of Ewing's sarcoma at a higher extent than untargeted nanoparticles in a model of subcutaneous implanted tumours. This demonstrated that the targeted nanoparticles were stealth *in vivo* in agreement with their low capacity to activate the complement system *in vitro*. Next step of this work will be to assess the efficiency of those nanoparticles against metastatic forms of Ewing's sarcoma, as it is the metastasis development that is responsible for poor prognosis in this cancer.

Acknowledgments:

The authors would like to thank the Association Leyla for founding AL Ramon's PhD grant. This work was supported by the INA Biosanté foundation. The authors also thank Henkel Biomedical for kindly providing the IBCA.

6. Bibliography:

1. Esiashvili, N., M. Goodman, and R.B. Marcus, Jr., *Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(6): p. 425-30.
2. Delattre, O., et al., *Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours*. Nature, 1992. **359**(6391): p. 162-5.
3. Turc-Carel, C., et al., *Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12)*. Cancer Genet Cytogenet, 1984. **12**(1): p. 1-19.
4. Hu-Lieskovan, S., et al., *EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4633-44.
5. Rorie, C.J., et al., *The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1266-77.
6. Thompson, A.D., et al., *Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells*. Oncogene, 1999. **18**(40): p. 5506-13.
7. May, W.A., et al., *EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 495-7.
8. Takigami, I., et al., *Synthetic siRNA targeting the breakpoint of EWS/Fli-1 inhibits growth of Ewing sarcoma xenografts in a mouse model*. Int J Cancer, 2011. **128**(1): p. 216-26.
9. Toub, N., et al., *Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma*. Pharm Res, 2006. **23**(5): p. 892-900.
10. Hu-Lieskovan, S., et al., *Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8984-92.
11. Alhaddad, A., et al., *Nanodiamond as a vector for siRNA delivery to Ewing sarcoma cells*. Small, 2011. **7**(21): p. 3087-95.
12. Chauvierre, C., et al., *Enhancing the tolerance of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles with a modular surface design*. Int J Pharm, 2007. **338**(1-2): p. 327-32.
13. de Martimprey, H., et al., *siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. e2.
14. de Martimprey, H., et al., *New core-shell nanoparticles for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma*. Pharm Res, 2010. **27**(3): p. 498-509.
15. Ambros, I.M., et al., *MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration*. Cancer, 1991. **67**(7): p. 1886-93.

16. Dubois, S.G., et al., *Flow cytometric detection of Ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow*. *Pediatr Blood Cancer*, 2010. **54**(1): p. 13-8.
17. Segura-Sanchez, F., et al., *Synthesis and characterization of functionalized poly(gamma-benzyl-L-glutamate) derivatives and corresponding nanoparticles preparation and characterization*. *Int J Pharm*, 2009. **387**(1-2): p. 244-52.
18. Huang, M., E. Khor, and L.Y. Lim, *Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation*. *Pharm Res*, 2004. **21**(2): p. 344-53.
19. Bravo-Osuna, I., G. Ponchel, and C. Vauthier, *Tuning of shell and core characteristics of chitosan-decorated acrylic nanoparticles*. *Eur J Pharm Sci*, 2007. **30**(2): p. 143-54.
20. Bertholon, I., C. Vauthier, and D. Labarre, *Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide*. *Pharm Res*, 2006. **23**(6): p. 1313-23.
21. Vauthier, C., et al., *Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles*. *Biomaterials*, 2011. **32**(6): p. 1646-56.
22. Wright, L.D., H.R. Skeggs, and E.L. Cresson, *Affinity of avidin for certain analogs of biotin*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1947. **64**(2): p. 150-3.
23. Elhamess, H., et al., *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles*. *Oligonucleotides*, 2009. **19**(3): p. 255-64.

Troisième partie : Interactions nucléotides/nanoparticules

1. Introduction

The nanoparticles studied here are designed to carry oligonucleotides to the cells in order to ensure a good pharmacological activity. The types of oligonucléotides the most commonly used as therapeutic agents are small interfering RNA (siRNA) or antisense oligonucléotides (ODN). In this work we studied the adsorption of siRNA and ODN molecules on chitosan decorated poly(isobutylcyanoacrylate)/chitosan nanoparticles and the *in vivo* behavior of siRNA carried by those nanoparticles and injected intravenously in mice. Those nanoparticles are chosen because their cationic chitosan shell allows both the efficient complexation of anionic molecules as oligonucleotides and a longer circulation time of the nanoparticles in the blood stream. Results show that siRNA and ODN, despite their similarity, don't have the same behavior during the adsorption on the nanoparticles. Moreover, small modifications of the surface of nanoparticles can have an important impact on their surface charge.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pluronic F68 (Lutrol F68) was purchased from BASF (Germany). Chitosan middle viscous was provided by Fluka (Germany). To obtain 20kDa chitosan, native chitosan was hydrolyzed as previously described by Bertholon *et al.* [16] (90mg of NaNO₂ for 2g of chitosan in 100mL of acetic acid 6%). The mean molecular weight of the chitosan was assessed using capilar viscosimetry. Isobutylcyanoacrylate (IBCA) was

provided by Henkel Biomedical (Ireland) and PolyFluor® 570 (methacryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (N-[9-(2-carboxy-x-methacryloxyethylthiolcarbamoyl-phenyl)-6-diethylamino-3H-xanthen-3-ylidene]-N-ethyl-ethanaminium chloride) was purchased from Polyscience, BioValley (France). Oligonucleotides were provided by Eurogentec (Belgium). Both the ODN and the siRNA sequence were directed against the EWS/Fli-1 junction oncogene and can be used in therapy ad inhibitors of that junction. The sequence of the siRNA used was: 5'-GCAGCAGAACCCUUCUUAUd(GA)-3' and the sequence of the 30-mer phosphorothioate ODN was : 5'-GTAGCGAAGGGTsTsCsTsGsCsTsGsCCCGTAGCTGC-3' in which «s» corresponds to a phosphorothioate nucleotide [123, 229]. The sequences and structures of the ODN and siRNA are presented in figure 1.

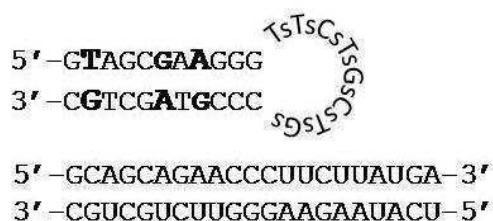


Figure 1: Morphology of the ODN and of the siRNA used for adsorption experiments. Nucleotides pictured in bold are the unpaired ones.

2.2. Methods

2.2.1. Synthesis of the nanoparticles

The nanoparticles of PIBCA / MMA-Rhodamine / Chitosan were synthesized by redox polymerization in emulsion by a method previously described [163, 230]. 68.8

mg of chitosan and 3.5% LutrolF68 were dissolved in 4 mL of 0.2N nitric acid in a glass vial at 42°C with vigorous stirring and argon bubbling. After 10 minutes 1ml of cerium (IV) at 80nM in a 0.2N nitric acid solution was added. Then 250µL of IBCA were added under vigorous stirring. Bubbling with argon was maintained for 10 minutes. After stopping the flow of argon, the nanoparticles were left at 42°C with stirring for 1 hour to complete the polymerization process. Then, the nanoparticles were cooled on ice for 5 minutes and dialyzed (SpectraPor membrane, MWCO:100.000, Biovalley) for 30 min, 30 min, 1 hour, 1 hour and then overnight against 1 liter of water MilliQ acidified with 1 ml of acetic acid 16 mM.

For the synthesis of nanoparticles labeled with rhodamine, the amount of IBCA is lowered to 125µL. After two minutes of reaction, 800µL of PolyFluor ® 570 (rhodamine Bmethacryloxyethylthiocarbamoyl chloride, Polyscience, BioValley, France) at 2mg/ml in acetonitrile were added to the stirred reaction [225]. After stopping the flow of argon, the nanoparticles were left at 42°C under vigorous magnetic stirring for 2 hours to complete the polymerization.

2.2.2. Biotinylation of the nanoparticles

PIBCA/Chitosan/MMA-Rhodamine nanoparticles were first diluted to 10mg/mL. EZ-Link® TFP-PEO3-biotin was added at concentrations of 1.4 mmol/L to the nanoparticle suspension to achieve nanoparticle biotinylation and allowed to react on a rotating wheel at room temperature for 2 hours in dark. Samples were dialyzed against sterile water (Spectra/Por membranes, MWCO: 100,000, Biovalley) for 30 min, 30 min, 1h, 1h and overnight to remove any excess of reactant.

2.2.3. Zeta potential of nanoparticles loaded with siRNA

The zeta potential of nanoparticles was measured with a Zetasizer 4 (Malvern Instrument Ltd, France). 80µL of nanoparticle suspension was diluted in 2mL of 1mM NaCl. The measurements were repeated at least three times.

2.2.4. Radiolabeling and complexation of siRNAs with nanoparticles

The siRNA and ODN were labeled on the 5' side with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [γ ³²ATP] (6000 mCi/mol). After 1 hour of incubation at 37°C, the siRNA and ODN were separated by gel filtration (Sephadex G25) and centrifugation (1500 rpm, 5 minutes). This filtration step also allows the removal of eventual small molecular weight impurities of the labelled siRNA.

The radiolabeled siRNA and ODN were associated with nanoparticles at NP/siRNA mass ratios ranging from 0 to 300 in a final volume of 300µL. After 10 minutes of incubation, the nanoparticles were ultracentrifuged (45 000 rpm, 1 h, 4°C in a 70.1 Ti rotor) and the radioactivity was measured in the supernatant.

2.2.5. Distribution of the radiolabeled siRNA complexed with nanoparticles

For the distribution of radiolabeled siRNA and carried by nanoparticles in mice bearing tumors, the ratio of NP/siRNA used was 50. The complexes of siRNA and nanoparticles were diluted in 100µL of Hepes/NaCl buffer and injected intravenously into the tail vein of mice. The total dose of siRNA injected per mouse was 24µg/kg. The total dose of injected radioactivity was 547 300 cpm. After 24h mice were killed (using a CO₂ chamber) and their tumors and organs were retrieved, then weighed

and grounded (FastPrep-24, MP biomedical, USA). After centrifugation of the tissues lysates obtained, the radioactivity was counted in the supernatant (Wallac 1409, Wallac, Pegasus Scientific Inc, USA). All experimentations were conducted under the French laws on animal experimentation and after approval of the internal ethic committee of the Institut Gustave Roussy.

3. Results and discussion

3.1. Complexing of the ODN and siRNA with the nanoparticles

We have evaluated the behavior of nanoparticles complexed with an antisense oligonucléotide (ODN). In the case of the ODN, the maximum percentage of ODN adsorbed on the surface of nanoparticles was only $79.4 \pm 5.9\%$ (Figure 2) hence a 16% decrease of the total amount of oligonucléotide associated with the nanoparticles. In addition, there is no plateau of adsorption; the amount of ODN adsorbed continued to increase with increasing amount of ODN in the suspension. At the ratio 1:50, there was $58.2 \pm 0.7\%$ of ODN adsorbed against $94.0 \pm 0.67\%$ for siRNA, hence a difference of 35.8%.

Polymeric nanoparticles are proposed in nanomedicine to improve *in vivo* delivery of various compounds. The nanoparticles considered in the present work were described to deliver siRNA to tumors [171, 230] and similar ones where used to carry ODN [123]. The ODN used included 30 nucleotides and corresponded to a 30-mer. Because of its sequence in nucleotides, the ODN used takes the shape of a double strand of 2 times 11 nucleotides and a loop composed of 8 free nucleotides (figure 1). The siRNA was composed of two strands of 21 nucleotides each. As it was a

double strand, it contained a total of 42 nucleotides. It takes the shape of a quite rigid rod. The difference of association of siRNA and ODN with the nanoparticles could be explained by the configuration of the two oligonucleotides. It can be suggested that the shape with the loop shown by the ODN was less favorable than the more compact shape taken by the siRNA to interact with the corona of chitosan chains stranded on the nanoparticle surface. These results suggested that the size and shape of the oligonucleotides are influencing the way the molecules are interacting with the nanoparticles hence the loading of the drug carrier.

3.2. Effects of the rhodamine labeling of the nanoparticles on the complexation with siRNA

Initially, we compared the ability of nanoparticles labelled with PolyFluor570 and unlabelled nanoparticles to adsorb siRNAs at their surface. Figure 2 shows the percentage of siRNA adsorbed on the surface of the nanoparticles as a function of NP/siRNA mass ratio. For nanoparticles with a core composed only of PIBCA, the maximum percentage achieved was $95.7 \pm 0.2\%$, while for nanoparticles composed of PIBCA and PolyFluor570, the maximum percentage reached was $96.2 \pm 1.1\%$. Moreover, in both cases the plateau was reached for a NP/siRNA mass ratio of 50. The results showed that the adsorption of siRNA onto the nanoparticles was not dependent on the composition of their core. Thus, the modification of the nanoparticles with PolyFluor570 was probably located only in the core of the nanoparticles. Those nanoparticles would be usable for *in vitro* and *in vivo* under the same conditions with regard to the siRNA loading parameters.

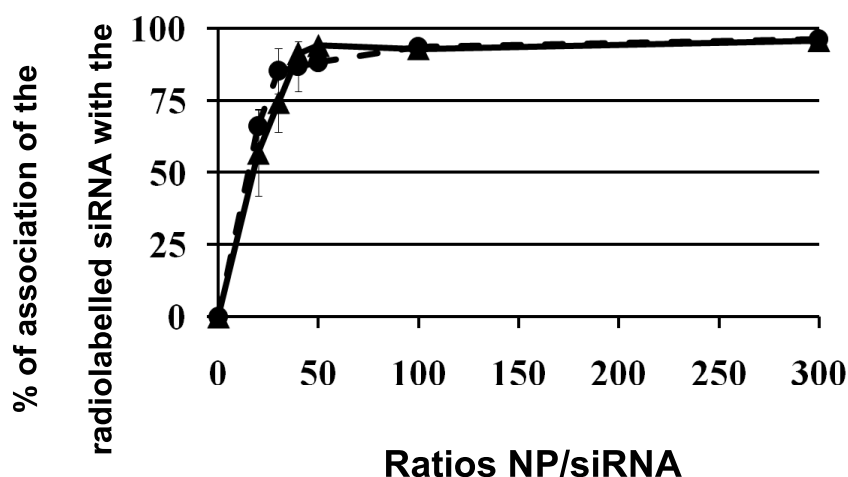


Figure 2: Adsorption of radiolabeled siRNA on PIBCA / Chitosan / MMA-Rhodamine / Pluronic F68 3.5% nanoparticles (●) and on PIBCA / Chitosan / Pluronic F68 3.5% nanoparticles (▲). This experiment was performed three independent times.

3.1. Association of siRNA with biotinylated and rhodamine labeled nanoparticles

As shown in figure 4, the nanoparticles of PIBCA / Chitosan / MMA-Rhodamine were cationic and their zeta potential was $+33 \pm 5$ mV. This value was slightly lower when the nanoparticles were modified with biotin ($+21 \pm 4$ mV). At low ratios NP/siRNA (20), the zeta potential of both types of nanoparticles was negative. By increasing the NP/siRNA ratio the zeta potential increased. It became positive above NP/siRNA ratio of 300 for non modified nanoparticles while the zeta potential of the biotinylated nanoparticles remained negative up to ratio 300.

The zeta potential of biotinylated nanoparticles loaded with siRNA was negative up to the 300 ratio, while the non biotinylated nanoparticles were cationic again at the ratio 30.

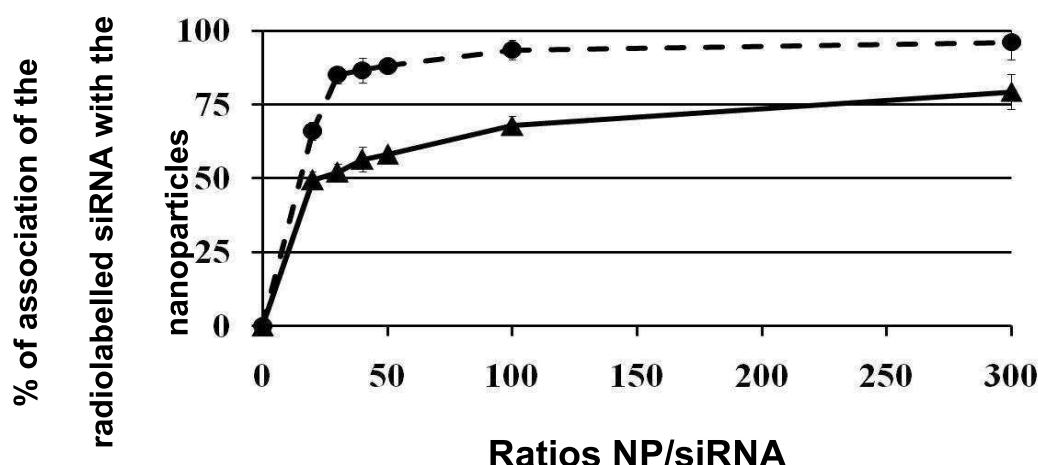


Figure 3 : Adsorption des siRNA et des ODN radiomarqués sur les nanoparticules PIBCA/Chitosane/MMA-Rhodamine/Pluronic F68 3.5%. This experiment was performed three independent times.

The development of targeted nanoparticles implied that biotin groups were grafted on the nanoparticles surface. This modified the zeta potential of the nanoparticles. Since it became 11.7 mV lower compared with the value of the zeta potential given by the unmodified nanoparticles. In agreement with this lower value shown by the biotinylated nanoparticles, the zeta potential further decreased by association of siRNA up to a ratio of 100. This means that the siRNA loaded biotin nanoparticles showed an opposite charge. This could greatly modify the *in vitro* and *in vivo* fate of the nanoparticles with respect to the interaction with proteins and cells. In addition, charge of nanoparticles is also an important factor contributing to the stability of the dispersion. In general, stability is better if the charge of the nanoparticles is outside the interval [-10mV; +10mV].

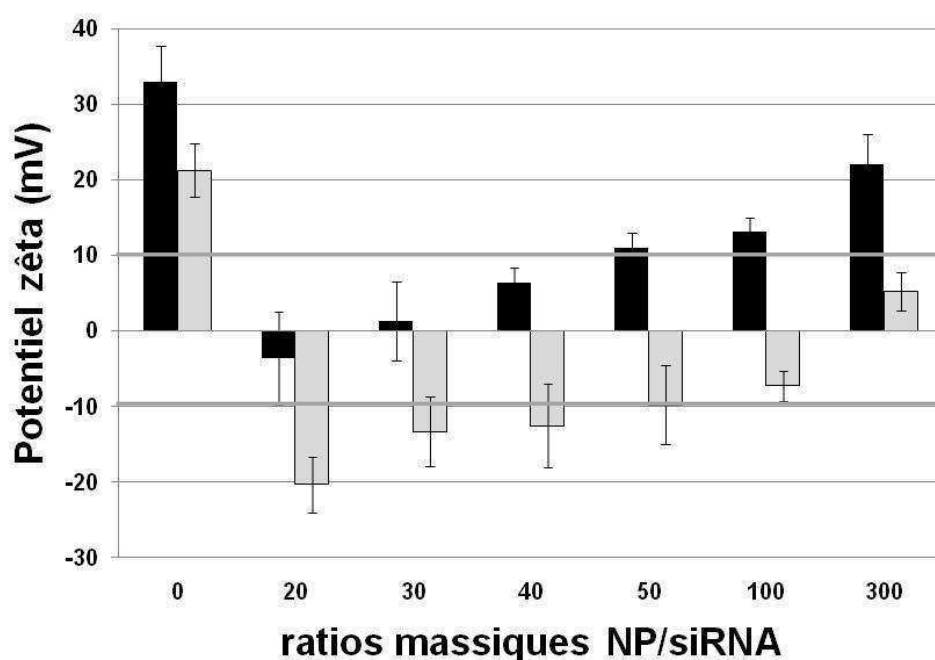


Figure 4: Effects of siRNA adsorption on the zeta potential of nanoparticles of PIBCA / MMA-Rhodamine /Chitosan / Pluronic F68 3.5% (■) and of biotinylated PIBCA / MMA-Rhodamine /Chitosan / Pluronic F68 3.5% (□).

Thus biotinylated nanoparticles could be more stable when associated with low amounts of siRNA while the non-biotinylated nanoparticles could be more stable from the ratio 50. At the NP/siRNA ratio of 50, used for biological testing, the stability of the dispersions should be satisfactory, although the zeta potential of the nanoparticles would have the same absolute value but an opposite sign.

3.2. *In vivo* biodistribution of radiolabeled siRNA complexes / nanoparticles

24 hours after injection of radiolabeled siRNA complexed with PIBCA/Chitosane/MMA-Rhodamine nanoparticles, mice were sacrificed and their organs were retrieved, weighted and the remaining radioactivity was measured and

expressed in percentage of the injected radioactivity per gram of tissue (figure 5A) or in count per minute/gram of organ (figure 5B). During the entire experiment mice were kept in metabolic cages, allowing retrieval of urines and feces.

Figure 5A shows that the biggest percentage of the initial radioactivity was found in the liver, spleen and muscle after 24h while a lower amount is found in the tumor.

However, figure 5B shows the count per minute of the radioactivity found in each organ without caring of the initial amount injected. Here, after 24h, the biggest amount of the radioactivity was found in urine. Moreover radioactivity was also found in several organs as liver, spleen, kidney, muscle, and lung and in the tumor. Very low amounts of radioactivity were found in blood, feces, heart or brain. This shows that there was only little elimination through the digestive tract and that most part of the siRNA was eliminated through renal elimination. Such renal elimination of siRNA complexed with nanocarriers and intravenously administered has already been described in the literature [231-232]

Moreover, in both cases, part of the radioactivity can be found in the brain. Knowing that neither the nanoparticles nor the full siRNA molecules are able to cross the blood brain barrier, it is likely that this radioactivity is due to degradation products and/or unbound [$\gamma^{32}\text{ATP}$] residues. Hence, this should be further investigated, for example by migrating extracts from the tissues on an agarose gel followed by an autoradiography to evaluate the integrity of the siRNA molecules in the organs.

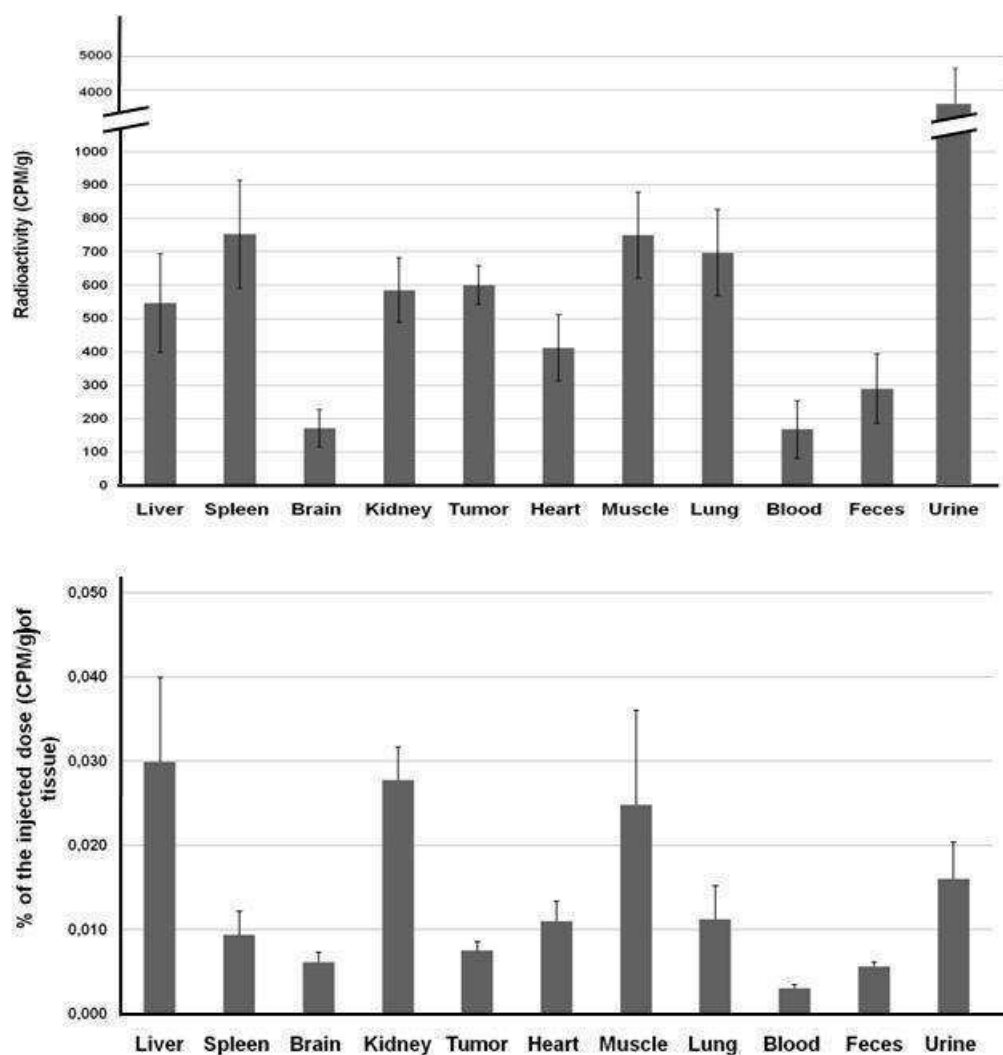


Figure 5 : Biodistribution of the NP/radiolabeled siRNA complexes in mice 24h after intravenous injection expressed as radioactivity count per gram of tissue (A) or as percentage of the injected dose per gram of tissue (B).

The biodistribution results showed that despite protection by the nanoparticles, siRNA may be still eliminated after 24h. Moreover, in figure B, despite their stealth characteristics brought by the chitosan shell, the amount of radioactivity found in liver and spleen equals the amount found in the tumor. Finally the radioactivity found in the kidneys in figure A and B was probably related to the renal elimination of the siRNAs. However, a large amount of radioactivity is found in muscle in figure A and B

which is surprising. Hence, those nanoparticles could be evaluated for their ability to carry siRNA or other nucleic acid derivatives to the muscle in diseases where muscles are affected.

4. Conclusion

In conclusion, those results showed that a small modification of the nanoparticles as adding biotin molecules at the surface, or of the nucleotides to be carried, can have great impact on the physico-chemical characteristics of the nanoparticles. Moreover, this work shows that despite the fact that the siRNA carried by the nanoparticles reach efficiently the tumor, improvement of the ability of the nanoparticles to reach the tumor is needed as other tissues accumulate the siRNA on the same extend than the tumor.

5. Bibliography

1. Elhamess, H., *et al.*, *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles*. *Oligonucleotides*, 2009. **19**(3): p. 255-64.
2. Maksimenko, A. and C. Malvy, *Oncogene-targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing sarcoma*. *Expert Opin Ther Targets*, 2005. **9**(4): p. 825-30.
3. de Martimprey, H., *et al.*, *New core-shell nanoparticules for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma*. *Pharm Res*. **27**(3): p. 498-509.
4. de Martimprey, H., *et al.*, *Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: oligonucleotides and siRNA*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009. **71**(3): p. 490-504.
5. Bravo-Osuna, I., G. Ponchel, and C. Vauthier, *Tuning of shell and core characteristics of chitosan-decorated acrylic nanoparticles*. *Eur J Pharm Sci*, 2007. **30**(2): p. 143-54.
6. de Martimprey, H., *et al.*, *siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(1): p. e2.
7. van de Water, F.M., *et al.*, *Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(8): p. 1393-7.
8. Shimizu, H., *et al.*, *siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. **21**(4): p. 622-33.

Quatrième partie :

Imagerie *in vivo* chez la souris

1. Introduction

Les techniques d'imagerie *in vivo* du petit animal ont pris une importance croissante au cours des dernières années. L'imagerie *in vivo* permet de réduire le nombre d'animaux de laboratoires utilisés comme le veut la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer) car il s'agit de techniques non invasives et non douloureuses. Les animaux n'ont pas besoin d'être sacrifiés à chaque étape d'une évaluation. Cette méthode d'imagerie permet la réalisation de cinétiques évitant l'introduction de biais liés à l'utilisation d'animaux différents. En pratique, les données de plusieurs animaux peuvent être enregistrées en même temps (jusqu'à 5 souris pour l'IVIS 50). Les applications de l'imagerie *in vivo* sont multiples. Par exemple, il est possible de détecter la propagation d'un parasite et la réponse inflammatoire associée [233], de suivre la mort d'une catégorie particulière de cellules, comme les neurones [234] ou des effets sur le cerveau comme dans le cas d'une méningite à pneumocoque [235], le développement de tumeurs [236-237] ou la distribution de nanoparticules [238-239].

Notre laboratoire dispose d'un accès à un système d'imagerie *in vivo* de la marque Calliper, l'*In Vivo* Imaging System 50 (IVIS 50) (figure 1). Cet appareil est composé d'une lampe halogène, d'une chambre d'acquisition reliée à un ordinateur ainsi que d'une chambre d'anesthésie.

Deux types de techniques de détection peuvent être utilisés: la bioluminescence et la fluorescence. La bioluminescence est l'émission de photons à la suite d'une réaction chimique produite dans un organisme vivant. La fluorescence est l'émission d'un rayonnement lumineux à la suite d'une stimulation par un autre rayonnement, appelé

rayonnement incident. Naturellement, les deux techniques présentent des avantages et des inconvénients récapitulés dans le tableau 1 :

	Fluorescence	Bioluminescence
Avantages	-utilisation de plusieurs sondes possibles -rapidité d'acquisition	-très sensible -faible bruit de fond
Inconvénients	-Photo-blanchiment -important bruit de fond dû à l'autofluorescence des tissus -atténuation du signal due aux tissus environnants -moins sensible que la luminescence	-injection d'un substrat à temps d'action limité avec un pic d'émission maximum donc un temps à respecter -atténuation du signal due aux tissus environnants -temps d'acquisition long -signal dépendant de la présence des substrats (luciférase, O₂, ATP) dont la présence peut différer quantitativement selon les tissus et les animaux.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la fluorescence et de la bioluminescence dans l'imagerie *in vivo* du petit animal

Dans notre travail, nous avons utilisé l'imagerie *in vivo* chez la souris pour mettre au point un modèle fluorescent de métastases du sarcome d'Ewing, visualiser la régression tumorale chez l'animal et suivre le devenir de nos nanoparticules chez la souris. Dans tous les cas nous avons choisi d'utiliser la fluorescence plutôt que la bioluminescence afin de pouvoir utiliser à terme plusieurs sondes en même temps (par exemple une sonde de fluorescence rouge pour la tumeur et une sonde de fluorescence verte pour les nanoparticules ou une sonde de fluorescence rouge pour les nanoparticules et une sonde de fluorescence verte pour les siRNA transportés). Un autre avantage de la fluorescence est de ne pas dépendre de l'injection d'un substrat dont la métabolisation peut être sujette à des variations. Par ailleurs, la fluorescence permet d'appliquer un temps d'acquisition plus rapide que la bioluminescence.

Afin de réaliser ce travail nous avons d'abord transfecté des cellules A673 et TC71 avec le plasmide mCherry puis sélectionné et caractérisé les lignées exprimant stablement la protéine mCherry. Dans une deuxième phase nous avons validé la tumorigénicité des lignées préparées en sous cutané (TC71 et A673) et en injection intraveineuse (TC71). Enfin, nous avons utilisé les cellules A673 injectées en sous cutané pour réaliser un effet dose des complexes siRNA/nanoparticules. La dernière partie de ce travail a consisté en la détection des nanoparticules marquées à la rhodamine dans les souris porteuses de tumeurs en utilisant également l'IVIS 50. Il est à noter que les deux dernières phases de ce chapitre présentent des résultats préliminaires qui restent donc à confirmer.

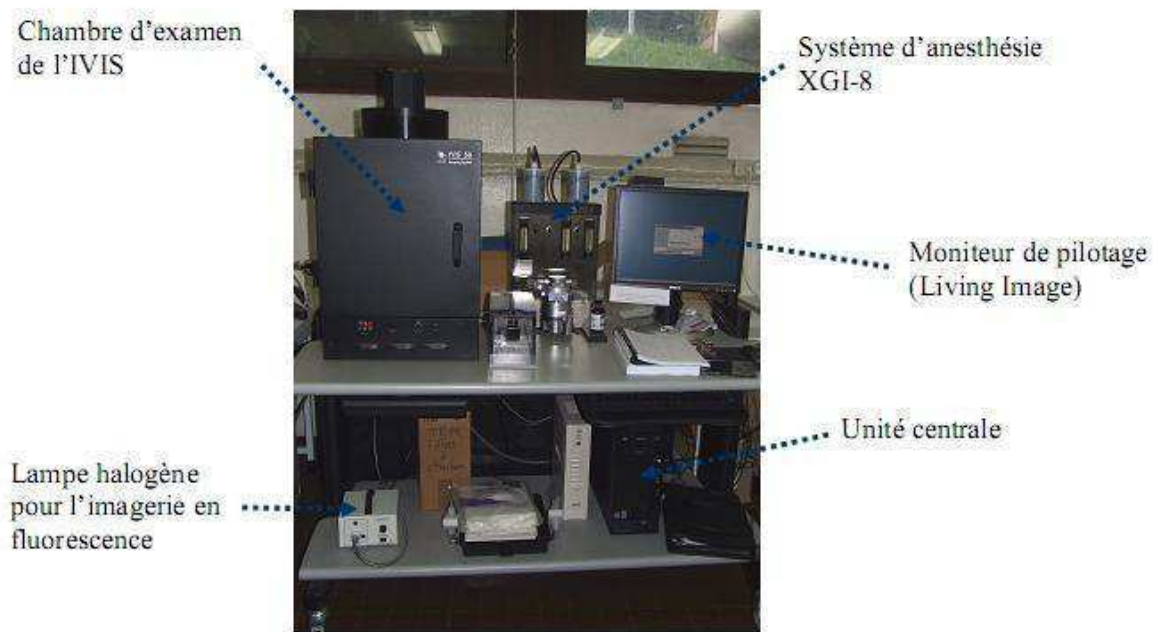


Figure 1 : Appareil d'imagerie de fluorescence et de bioluminescence *in vivo* chez le petit animal Xenogen IVIS 50 (image extraite du manuel d'utilisation de l'IVIS rédigé par Valérie Rouffiac, Ingénieur de recherche Imagerie, IGR)

2. Matériel et méthodes

2.1. Préparation de lignées cellulaires transfectées par un plasmide codant pour la protéine fluorescente mCherry

2.1.1. Transfection du plasmide mCherry dans les lignées cellulaires d'Ewing et sélection des clones

Les cellules A673 et TC71 ont été cultivées en plaques 100 mm (BD Falcon, USA). A 70% de confluence, les cellules ont été transfectées avec des complexes lipofectamine/plasmide mCherry (Clontech, carte figure 1). 24 heures après la transfection, le milieu a été remplacé par du milieu enrichi en G418 (Geneticine,

Gibco) à une concentration de 500 µg/mL afin de sélectionner les clones ayant intégré stablement le plasmide (résistance au G418 par expression du gène Néo) et produit la protéine mCherry. Les clones apparaissent au bout de deux semaines. Ils sont prélevés et repiqués individuellement en plaques de culture 12 puits (BD Falcon, USA), amplifiés puis congelés dans l'azote liquide (SVF 90%/DMSO 10%).

2.1.2. Vérification en PCR de la présence de mCherry dans les clones sélectionnés

Afin de vérifier la présence du plasmide mCherry dans les clones sélectionnés, nous avons réalisé une RT-PCR sur les cellules transfectées. L'ARN total a été extrait des différents clones par lyse des cellules avec 800 µl de Trizol (Invitrogen, USA) suivie d'une extraction avec 260 µL de chloroforme/alcool isoamylique et agitation sur vortex pendant 10 secondes. Après 15 minutes, les échantillons ont été centrifugés 15 minutes (13 000 rpm) afin de séparer la phase aqueuse contenant l'ARN de la phase organique. La phase aqueuse a ensuite été transférée dans un autre tube et l'ARN a été précipité avec le même volume d'isopropanol. Après centrifugation (13 000 rpm), les culots obtenus ont été lavés deux fois avec 1 mL d'éthanol 70 %. Après séchage les culots ont été repris par 10 µL d'eau stérile/RNasin (0,5 UI/µL). Les échantillons d'ARN totaux ainsi obtenus ont ensuite été dosés à l'aide d'un spectromètre UV (260nm). L'analyse par RT-PCR a été réalisée comme suit: 1 µg d'ARN total pour chaque échantillon a ensuite été mélangé à 2 µL de Random Primers (50 µg/mL), 4 µL de buffer 5X, 0,5 µL de dNTP à 20 mM, 0,5µL de RNasin (40 µg/µl), 0,5 µL de RT ase (200 U/µl). Le mélange a été placé 1 heure à 42°C. 2 µL de l'ADNc obtenu a ensuite été utilisé pour réaliser une PCR. Pour chaque échantillon le mélange réactionnel utilisé était: 5 µL de Taq Pol buffer 10X (New

England Biolabs), 0,5 µL de dNTP 20mM, 0,5 µL de chacun des primers utilisés, 41 µL d'eau stérile et 0,5 µL de Taq DNA Polymerase (New England Biolabs). Les échantillons ont ensuite été placés dans un Thermo Cycler pour réaliser la PCR (PTC-200 Thermo Cycler, MJ Research, USA) dans des tubes à PCR de 0.5 mL dans les conditions suivantes:

- pour la GAPDH: 94°C pendant 5 min, 59°C pendant 45 sec, 72°C pendant 4 min, puis 30 fois le cycle (94°C 45 sec, 65°C 45 sec et 72°C 4 min) puis 72°C pendant 5 minutes et refroidissement à 15°C.
- pour mCherry: 25 fois le cycle (94°C pendant 2,5 min, 68°C pendant 30 sec, 72°C pendant 1 min) puis 72°C pendant 5min et refroidissement à 15°C

Les produits issus de la PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Pour cela, 3µL de tampon de charge ont été mélangés à 7.5µL des produits de PCR GAPDH et 7.5µL des produits de PCR mCherry. 15µl de chaque échantillon ont été déposés dans un gel d'agarose 2% dans du tampon Tris-acetate-EDTA (TAE) 0.5X et migré dans du TAE0.5X à 50V pendant 1h. Le gel ainsi obtenu est incubé dans un bain de TAE0.5X/BET pendant 15 minutes puis révélé aux UV.

2.2. Test de tumorigénicité des lignées transfectées

Afin de vérifier que les lignées transfectées avec le plasmide mCherry n'avaient pas perdu leur capacité à former des tumeurs *in vivo*, nous avons injectés les clones les plus fortement fluorescents chez la souris par voie sous cutané. Pour cela 2,5 millions de cellules ont été injectées par souris au niveau du flanc droit dans 100µL de sérum physiologique. Après une semaine, la taille des tumeurs a été évaluée à l'aide d'un pied à coulisse ainsi qu'au moyen de l'imageur IVIS 50 (Calliper).

2.3. Validation du modèle TC71-mCherry IV

Les cellules TC71 sont connues pour former des métastases chez la souris [158]. Afin de vérifier que les cellules TC71 modifiées avec le plasmide mCherry avaient conservé cette propriété 5 millions de cellules diluées dans 100 μ L de sérum physiologique ont été injectées chez la souris par voie IV dans la veine de la queue. Après une semaine, la fluorescence émise par les souris a été enregistrée avec l'IVIS 50 (Calliper).

3. Effet dose des complexes nanoparticules/siRNA sur la lignée A673-mCherry implantée en sous cutané

3.1. Implantation des tumeurs et traitement des souris

Afin de valider l'utilisation de la lignée A673-mCherry produite, et de déterminer la meilleure dose utilisable un effet dose a été réalisé sur un petit nombre de souris. Pour cela 6 souris ont été divisées en 3 groupes (non traitées, et deux doses de siRNA vectorisés par des nanoparticules PIBCA/Chitosane: 2,5 mg/kg total et 120 μ g/kg total) et injectées dans le flanc droit avec 2,5 millions de cellules A673-mCherry. Lorsque les tumeurs ont atteint 50mm³, les souris ont été traitées par voie IV dans la veine de la queue tous les deux jours par un total de 5 injections (0,5 mg/kg ou 24 μ g/kg par injection respectivement dilués dans 100 μ L de serum physiologique). La croissance tumorale a ensuite été suivie au pied à coulisse ainsi qu'à l'aide de l'IVIS 50 (Calliper). Le lendemain de la dernière injection les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été récupérées dans du TRIzol[®] (Invitrogen, Etats-Unis), pour extraction d'ARN total ou du tampon RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay), pour analyse des protéines par western blot.

3.2. Analyse des tumeurs en RT-qPCR

L'ARN a été extrait des tumeurs dans 800µL de TRIzol® auxquels on a ajouté 160µL de chloroforme et le mélange a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 min. Puis, 350 µL de la phase aqueuse résultante ont été mélangés avec le même volume d'isopropanol, incubés pendant 15 min à température ambiante et centrifugés à 13 000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot a été lavé deux fois en utilisant de l'éthanol à 70%, laissé sécher et repris dans 10µL d'eau contenant 0,5 unité/µL de RNasin (Promega, Etats-Unis). L'ARN total a été quantifié (260nm) en utilisant un spectrophotomètre UV. La transcription inverse a été réalisée sur 1 µg d'ARN total en ajoutant 2 µL de random primers à 50 µg/µL (Promega, Etats-Unis) et chauffés à 65°C pendant 5 min. Puis l'ARN a été incubé avec 0,5 µL de transcriptase inverse M-MLV à 200 unités/µL, 0,5 µL de dNTP 20 mM, 0,5 µL de RNasin 40 unité/µL et 4 µL de tampon M-MLV 5X (Promega) pendant 1 h à 42 ° C.

La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée à l'aide SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) en utilisant 5 µL d'ADNc dilué à 1/20 (v/v) dans un volume final de 25 µL. Les échantillons ont été amplifiés avec 45 cycles en utilisant 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Etats-Unis) comme suit: 2 min d'incubation à 50°C, 10 min à 95°C, suivie par 45 cycles à 95°C pendant 15sec et 60°C pendant 1 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux échantillons de tumeurs non traitées.

3.3. Analyse des tumeurs par immunoprécipitation suivie d'un western-blot

Les protéines ont été extraites de tumeurs dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mM Tris, pH 8.0) avec inhibiteur de protéases (Complete protease inhibitors, Roche, Allemagne). La concentration en protéines

dans les échantillons a été déterminée grâce au dosage de protéines à l'acide bichromique (BCA) (microBCA kit, Thermo Fisher Scientific Etats-Unis) selon les indications du fournisseur. 250 µg de protéines ont ensuite été immunoprécipitées grâce à 1µL d'anticorps anti-Fli-1 (Santa-Cruz Biotechnologies, Etats-Unis) dans un volume total de 1mL de RIPA et laissés à réagir une nuit. Puis 20 µL de protéine G-Sepharose[®], Fast Flow (Sigma-Aldrich, États-Unis) ont été ajoutés et incubés à 4 ° C sur une roue tournante pendant 2 heures. Après incubation, les échantillons ont été centrifugés et le surnageant a été remplacé par 20 µL de tampon de western blot et chauffé pendant 10 min à 95°C, puis centrifugé. Le surnageant a été migré en SDS-PAGE sur gel d'agarose et révélé par l'anticorps anti-Fli-1 (Santacruz biotechnologie, États-Unis).

3.4. Synthèse des nanoparticules

Les nanoparticules de Poly(isobutylcyanoacrylate) (PIBCA)/Chitosane ont été synthétisées comme précédemment décrit par polymérisation radicalaire en émulsion [171]. Pour cela, 0,0688g de chitosane hydrolysé et 175 mg de Lutrol F68 ont été dissous dans 4 mL d'une solution aqueuse d'acide nitrique 0,2 N dans un pilulier en verre porté à 42°C au bain marie, sous agitation et sous bullage d'argon. Après 10 minutes, 1mL d'une solution de Cérium (IV) à 80mM dans de l'acide nitrique 0,2 N a été ajouté. Ensuite 250 µL d'isobutylcyanoacrylate (IBCA) ont été ajouté sous agitation vigoureuse et le bullage d'argon a été maintenu pendant 10 minutes. La réaction a été ensuite poursuivie à 42°C pendant 40 minutes. Après refroidissement dans la glace pendant 5 minutes, la suspension obtenue a été dialysée (Spectra/Por membranes, MWCO: 100000, Biovalley) pendant 2 fois 30 min, 2 fois 1h et une nuit contre de l'eau MilliQ (1L) acidifiées avec 1 mL d'acide acétique 16mM.

Pour marquer les nanoparticules, 800µL de monomère de méthylméthacrylate rhodamine, (PolyFluor® 570, méthacryloxyéthylthiocarbamoyl rhodamine B (N-[9-(2-carboxy-x-méthacryloxyéthylthiolcarbamoyl-phenyl)-6-diéthylamino-3H-xanthen-3-ylidene]-N-éthyl-ethanaminium chloride, Polyscience, BioValley, France) ont été solubilisés dans de l'acétonitrile (2 mg/mL) ont été ajoutés 2 minutes après addition du monomère de cyanoacrylate (125 µL) [225].

La concentration des nanoparticules obtenues a été calculée après lyophilisation et pesée d'un échantillon de 1mL de suspension.

4. Résultats

4.1. Création et caractérisation des lignées TC71-mcherry et A673-mCherry.

Evaluation de la tumorigénicité de ces lignées chez la souris nude.

Le plasmide mCherry dont la carte est représentée en figure 2 a été transfecté dans les lignées cellulaires du sarcome d'Ewing A673 et TC71. La figure 3 montre les résultats de RT-PCR obtenus par analyse des clones de cellulaires sélectionnés après transfection. Les résultats montrent que le plasmide est bien présent dans les lignées obtenues après sélection par le G418 et amplification. Aucune détection du plasmide n'a été mise en évidence dans les lignées natives confirmant la spécificité des amorces.

Les lignées transfectées sélectionnées restent tumorigènes comme le montre l'apparition de tumeurs après implantation en sous cutané (figure 4). Leur fluorescence est détectable par le système IVIS comme le montre la figure 5. De

manière tout à fait intéressante, la fluorescence est également détectable *in vivo* par notre système d'imagerie après injection des cellules transfectées par mCherry par voie intraveineuse (figure 6). L'apparition de la fluorescence a été progressive dans le temps (figure 6 de gauche à droite) jusqu'à être généralisée. L'autopsie des animaux ayant reçu injection IV de cellules TC71-mCherry a montré une complète invasion d'un poumon chez deux des souris sur trois. Ces poumons, après autopsie, étaient fluorescents et visiblement métastasés. Cependant des injections supplémentaires dans d'autres souris sont nécessaires afin d'évaluer la part de la fluorescence visible qui est réellement associée à l'apparition de métastases.

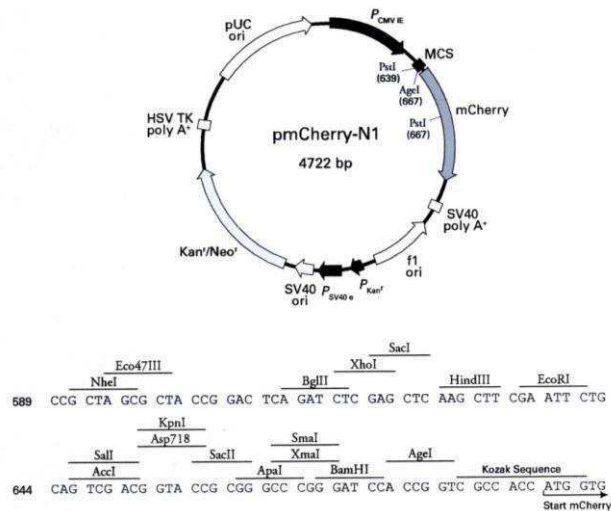


Figure 2 : Carte du plasmide mCherry-N1 transfecté dans les cellules A673 et TC71 (www.clontech.com).

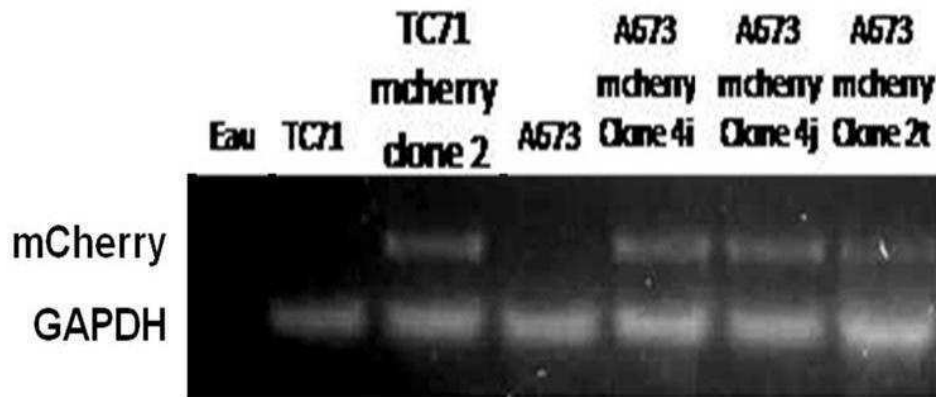


Figure 3: PCR sur des cellules TC71 et A673 transfectées ou non avec le plasmide mCherry.

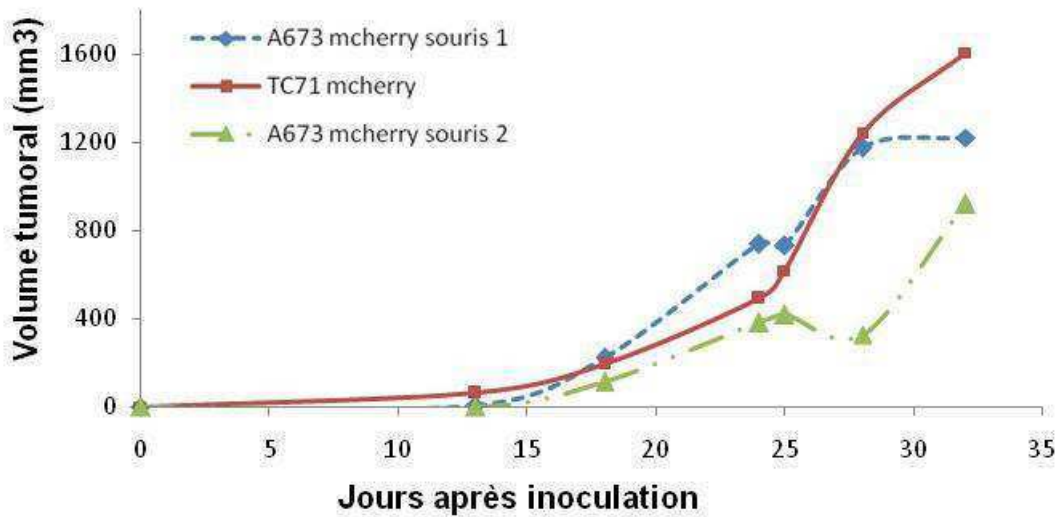


Figure 4: Tumorigénicité des lignées Ewing TC71-mCherry et A673-mCherry injectées par voie SC (2,5 millions de cellules/souris)

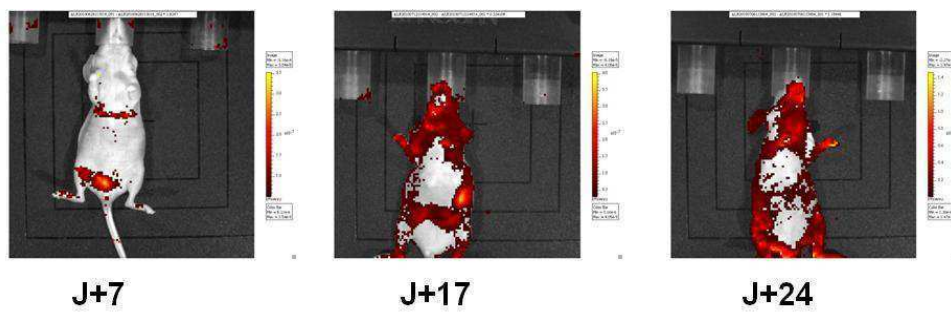


Figure 5 : tumeur sous cutanée TC71-mCherry (gauche) et tumeur sous-cutanée A673-mCherry (droite) observées à l'IVIS.

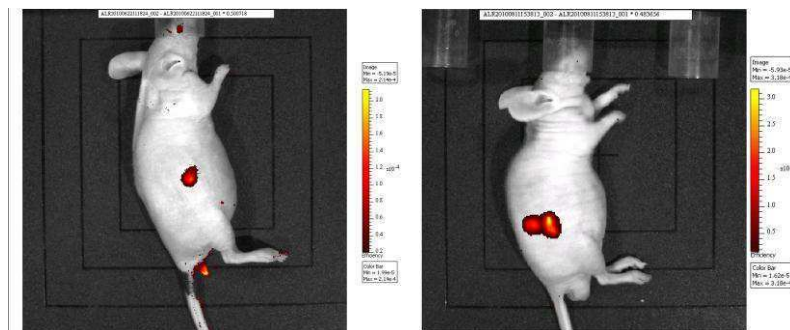


Figure 6 : Apparition de la fluorescence chez une souris après injection de 5 millions de cellules TC71-mCherry par voie IV dans la veine de la queue.

4.2. Utilisation de tumeurs fluorescentes dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement avec des siRNA formulés sous forme de complexes avec des nanoparticules

La figure 7 montre l'évolution de la taille des tumeurs déterminée selon deux méthodes: la mesure directe du volume tumoral (à gauche) ou la mesure de la fluorescence émise (à droite). Ces deux méthodes permettent de mettre en évidence une inhibition de la croissance tumorale lorsque les tumeurs sont traitées avec le siRNA EWS/Fli-1 en IV quelque soit la dose utilisée (120 µg/kg ou 2,5 mg/kg).

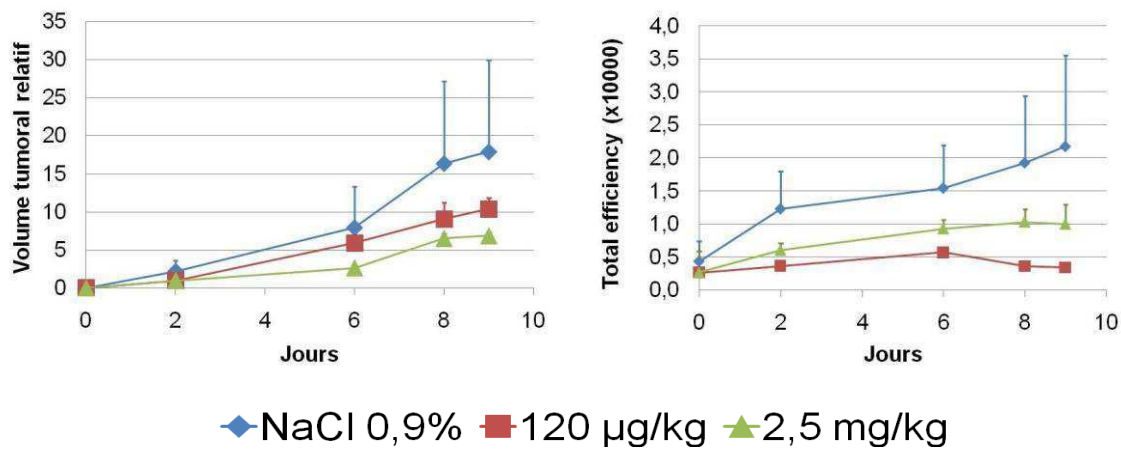


Figure 7 : Suivi de la taille des tumeurs au cours du traitement en IV. A gauche par la mesure manuelle du volume tumoral au pied à coulisse et à droite par la mesure de la fluorescence observée à l'IVIS

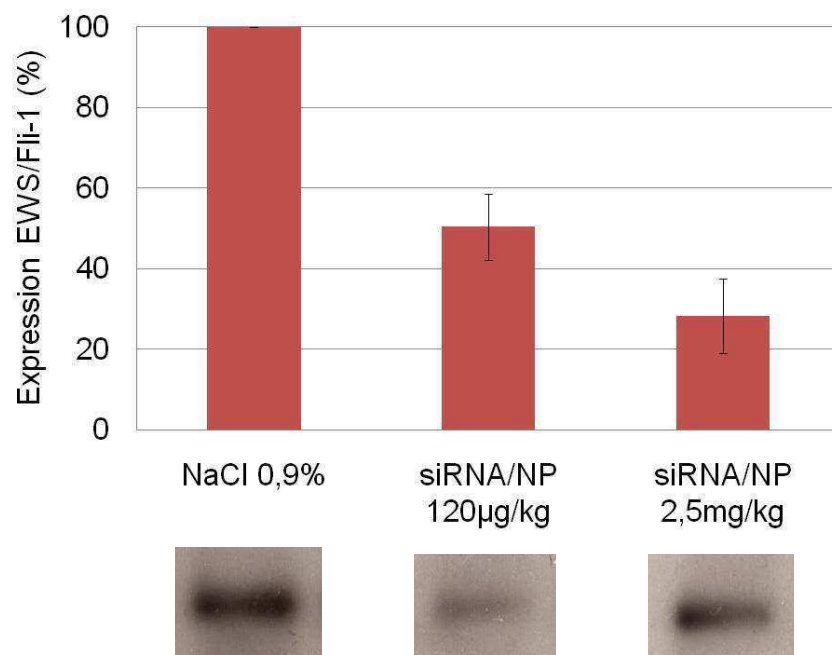


Figure 8 : qRT-PCR (en haut) et Western blot après immunoprécipitation (en bas) des tumeurs non traitées (NaCl 0,9%), traitées avec 120 µg/kg de siRNA vectorisés (siRNA/NP 120 µg/kg) ou 2,5 mg/kg de siRNA vectorisés (siRNA/NP 2,5 mg/kg).

Les résultats de qPCR et de western blot présentés en figure 8 montrent qu'EWS/Fli-1 est significativement inhibé. L'inhibition observée est de 50% pour 120 µg/kg et de 70% à 2,5 mg/kg. Cette inhibition est retrouvée au niveau protéique (figure 8). Compte tenu du faible gain d'efficacité entre 120 µg/kg et 2,5 mg/kg par rapport à l'augmentation de la dose, nous avons choisi de réaliser nos expériences suivantes à la dose de 120µg/kg.

4.3. Biodistribution des nanoparticules chez la souris

L'imagerie *in vivo* du petit animal peut également être utilisée pour réaliser le suivi et la distribution de nanovecteurs injectés chez la souris. Dans un premier temps nous avons injecté en IV dans la veine de la queue une dose unique de 5 mg de nanoparticules seules (figure 9). Cette dose est bien supérieure aux doses employées dans nos essais thérapeutiques mais elle permet de visualiser de manière évidente (c'est-à-dire largement au dessus de l'auto fluorescence des tissus) les nanoparticules dans la tumeur et dans les organes prélevés. Les résultats montrent une accumulation des nanoparticules dans la tumeur située sur le flanc de la souris. De plus, après autopsie, et de manière surprenante, la tumeur seule est peu fluorescente.

Toutefois, si on ouvre la tumeur, la fluorescence émise par la tumeur est visible à l'IVIS. Une coloration est également retrouvée dans l'estomac et les intestins, mais celle-ci correspond probablement à des traces dues à l'alimentation de l'animal (les déjections sont également habituellement fluorescentes). Cependant, de la fluorescence est également visible au niveau du muscle (muscle de la cuisse), du

foie et de la rate ce qui confirme les expériences réalisées précédemment avec des siRNA radio marqués transportés par nos nanoparticules (cf. partie 3).

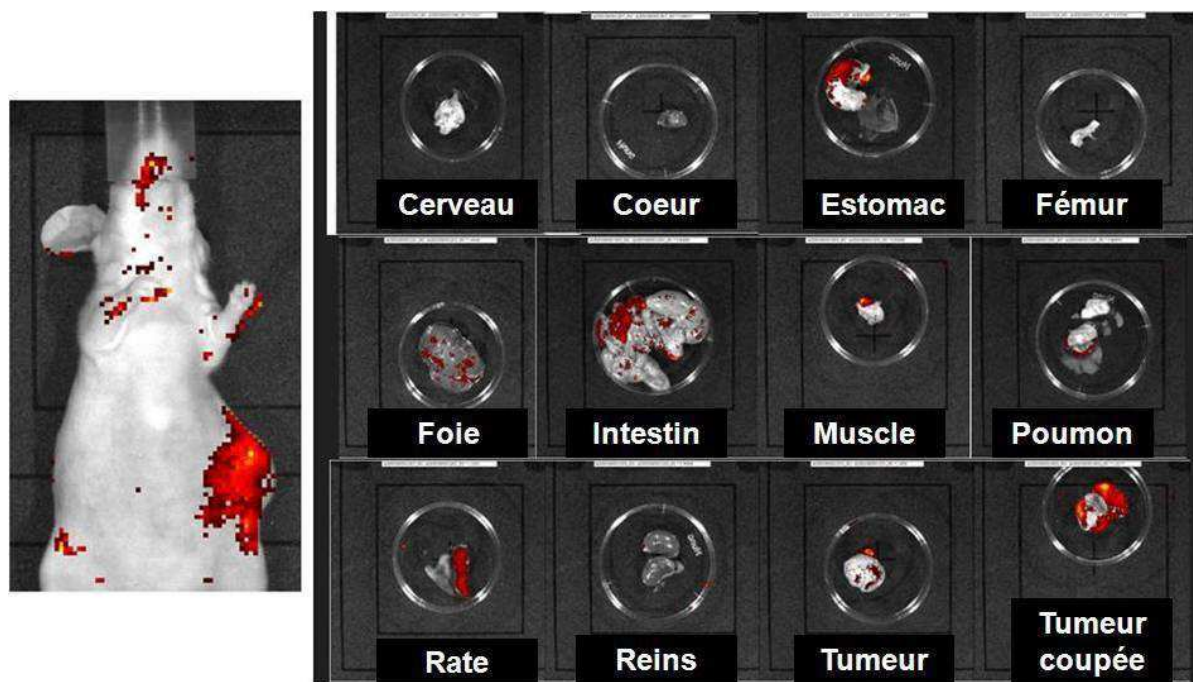


Figure 9 : Imagerie d'une souris ayant reçu 5 mg de nanoparticules rhodamine par voie IV dans la veine de la queue (24 heures après injection)

Dans un deuxième temps nous avons utilisé une dose de nanoparticules plus faible (1,5 mg). De plus nous avons évalué la distribution des nanoparticules PIBCA/Chitosane seules ou des nanoparticules PIBCA/Chitosane ciblées. Les résultats présentés figure 10 montrent que la fluorescence observées est plus importante dans la tumeur après injection de nanoparticules ciblées (en rouge) par rapport aux nanoparticules non ciblées (en bleu). Cela suggère que l'accumulation des nanoparticules est plus importante et plus rapide lorsque celles-ci sont ciblées vers la tumeur. Cependant cette expérience devra être répétée sur un plus grand nombre d'animaux.

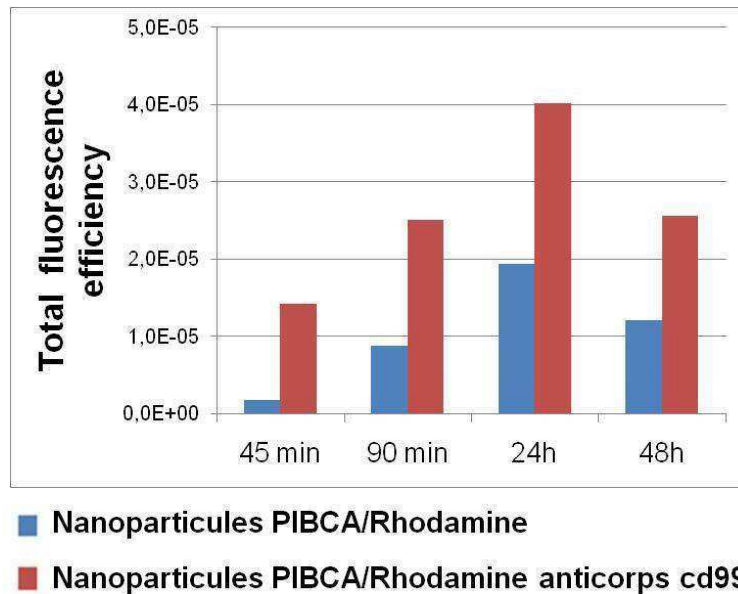


Figure 10 : Evolution de la fluorescence en fonction du temps dans la tumeur exprimée par gramme de tissus après injection de nanoparticules (1,5 mg) marquées à la rhodamine et chargées en siRNA. Résultats préliminaires obtenus avec une souris par condition.

5. Discussion

Nous avons développé au laboratoire un modèle métastatique de sarcome d'Ewing à partir de cellules humaine TC71 exprimant stablement le gène fluorescent mCherry. Un modèle souris du sarcome d'Ewing a déjà été développé dans le groupe de Hu-Lieskovan [158] en utilisant des cellules TC71 bioluminescentes pour suivre la croissance et la régression de métastases chez la souris. Le fait d'utiliser un marqueur fluorescent à la place de la luciférase nous permet de nous affranchir de l'injection d'un substrat et de réduire le temps consacré à l'acquisition du signal émis par chaque souris. Cependant, l'utilisation de la protéine mCherry présente certains

inconvenients : une sensibilité inférieure à celle de la luminescence ainsi que la détection qu'un accroissement du bruit de fond dû à l'auto fluorescence des tissus.

Nous avons transfecté les cellules TC71 et A673 avec le plasmide pmCherry-N1 et avons contrôlé d'une part l'expression stable de la protéine fluorescente (Figure 3) et le fait que les cellules étaient toujours capables de donner des tumeurs chez la souris (Figures 4 et 5). La mesure de la prolifération tumorale par la détection de fluorescence émise par les cellules cancéreuses présente un avantage majeur par rapport à la mesure de la croissance tumorale basée sur la mesure du volume de la tumeur à l'aide du pied à coulisse. En effet, le volume tumoral peut continuer à augmenter alors que les tumeurs sont nécrosées et donc qu'une partie des cellules sont mortes.

Les techniques d'imagerie de fluorescence tiennent compte de la nécrose tissulaire car les cellules mortes n'émettent plus de signal de fluorescence. On s'attend à ce que cette technique permette d'accroître la sensibilité de détection des effets anti-tumoraux des traitements. Sur la figure 7 il apparaît si l'on a pu montrer que le traitement des tumeurs par des complexes siRNA-nanoparticules semble diminuer la croissance tumorale, il semble que les deux techniques soient équivalentes lorsque l'on utilise des cellules A673 et que l'on traite avec des siRNA. De plus, la réalisation de coupes ultérieures des tumeurs traitées dans les mêmes conditions n'a pas permis de mettre en évidence d'importantes zones nécrosées dans les tumeurs. Dans le cas des cellules A673 traitées par des siRNA, l'utilisation de l'IVIS n'apporte donc pas de bénéfice en regard du surcoût engendré, de la nécessité d'anesthésier les animaux ainsi que du temps d'expérimentation plus long qu'une simple mesure au pied à coulisse. Cependant cette technique pourra être utilisée et réévaluée pour le traitement d'autres types de tumeurs ou pour l'évaluation d'agents de

chimiothérapie. Ceci pourra permettre de valoriser d'éventuels candidats médicaments, inefficaces si l'on se réfère uniquement au volume tumoral simple car entraînant une nécrose au cœur des tumeurs.

Cependant, l'inhibition de la croissance tumorale observée au cours du traitement des souris par les complexes siRNA-nanoparticules est bien due à un effet antisens des siRNA vectorisés, car la mesure du taux d'expression de l'ARNm d'EWS-Fli1 montre l'inhibition dose dépendante de EWS/Fli-1 au niveau du messager et de la protéine (Figure 8).

Nous avons alors recherché si ces cellules TC71 transformées avec mCherry étaient capables de se disséminer chez l'animal par injection intra veineuse et de former des tumeurs mimant les métastases observées dans le sarcome d'Ewing. Les cellules TC71-mCherry injectées par voie intraveineuse ont donné des tumeurs détectables par l'imagerie de fluorescence chez l'animal vivant en fonction du temps (Figure 6). A l'autopsie, des tumeurs pulmonaires exprimant la protéine fluorescente ont été détectées. Ceci constitue une localisation compatible avec la dissémination des cellules d'Ewing lors de l'apparition des métastases [158]. L'efficacité du traitement de ces tumeurs devra être effectuée pour valider ce modèle et déterminer si les siRNA vectorisés par des NP ciblées ou non peuvent efficacement bloquer la propagation des métastases ainsi créées. Ceci validerait le modèle mis en place dans ce travail.

Cependant, l'imagerie par fluorescence sur les animaux vivant peut trouver d'autres applications et en particulier de suivre la distribution de principes actifs si ils sont fluorescents. Pour cela nous avons marqués à la rhodamine les nanoparticules de

PIBCA/Chitosane. Après injection dans la veine de la queue d'une dose de 5 mg de nanoparticules marquées (Figure 9) nous avons détecté un fort signal de fluorescence au niveau de la tumeur montrant une accumulation de celle-ci dans ce tissu, probablement par un effet EPR (Enhanced Permeation and Retention) [240]. Toutefois, les autres compartiments tissulaires ne sont pas accessibles directement si ils se situent en profondeur dans l'animal par rapport à la tumeur sous cutanée. Après dissection de l'animal, la fluorescence est retrouvée dans la tumeur, le foie, la rate et les poumons de l'animal ainsi que dans le muscle. Ceci constitue une localisation compatible avec ce qui avait été observé pour des nanoparticules-Chitosane d'un autre type véhiculant des ODN radioactifs [123]. De façon surprenante de la fluorescence a été retrouvée dans le système digestif (estomac et intestins). Ceci pourrait soit être dû à l'alimentation des animaux soit être mis en corrélation avec une voie d'excrétion des nanoparticules ou de leurs produits de métabolisation.

Le suivi dans le temps de l'accumulation des nanoparticules fluorescentes dans la tumeur montre que celle-ci croît pendant les première 24h après l'injection puis cette concentration décroît lentement dans la tumeur (Figure 10). Cette méthode de fluorescence permet le suivi aisé de la cinétique d'accumulation de notre composé ainsi que sa vitesse d'élimination. Ceci nous donne des informations sur l'efficacité de ce vecteur et permettra d'adapter le protocole d'injection à la dose résidente dans la tumeur. La technique de l'IVIS semble donc prometteuse pour le suivi de la distribution de nos nanoparticules avec ou sans ciblage. L'intérêt principal de cette technique réside dans le fait que, là aussi, un suivi est possible sans avoir à sacrifier les animaux et donc en s'affranchissant des variations inter individuelles. D'autre part, les techniques classiques pour réaliser ce type d'étude supposent l'injection

d'un composé radio marqué, qu'il peut être souhaitable de remplacer par une méthode plus sûre comme celle proposée. Enfin, il peut également être envisagé d'injecter plusieurs sondes fluorescentes avec des spectres d'émission différents afin de suivre plusieurs parties d'un système (différents polymères le composant par exemple) ou de différencier la cinétique du système galénique de celle du produit transporté.

6. Conclusion

A la suite de ce travail, nous disposons d'une série d'outils d'imagerie *in vivo* chez la souris, dont un modèle de métastases du sarcome d'Ewing fluorescentes, ainsi que de la possibilité de suivre le devenir de nanovecteurs marqués à la rhodamine au sein de l'organisme des souris. Ces nouveaux outils seront utiles à l'avenir pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques et/ou de nouveaux systèmes galéniques *in vivo* avec la possibilité de réaliser un suivi sur des temps allant de quelques heures à plusieurs jours, tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. De plus il pourra être envisagé d'améliorer ces techniques afin de pouvoir utiliser plusieurs marqueurs fluorescents de manière concomitante afin de différencier facilement le devenir du vecteur de celui du principe actif vectorisé.

7. Bibliographie

1. Davies, S.J., et al., *In vivo imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs*. Int J Parasitol, 2005. **35**(8): p. 851-9.
2. Zhu, L., et al., *Non-invasive imaging of GFAP expression after neuronal damage in mice*. Neurosci Lett, 2004. **367**(2): p. 210-2.
3. Kadurugamuwa, J.L., et al., *Reduction of astrogliosis by early treatment of pneumococcal meningitis measured by simultaneous imaging, in vivo, of the pathogen and host response*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 7836-43.
4. Lyons, S.K., et al., *The generation of a conditional reporter that enables bioluminescence imaging of Cre/loxP-dependent tumorigenesis in mice*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7042-6.
5. Vooijs, M., et al., *Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1862-7.
6. Yagi, N., et al., *A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo*. Cancer Res, 2009. **69**(16): p. 6531-8.
7. Xiao, K., et al., *A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer*. Biomaterials, 2009. **30**(30): p. 6006-16.
8. Hu-Lieskovan, S., et al., *Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8984-92.
9. de Martimprey, H., et al., *siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. e2.
10. Bravo-Osuna, I., G. Ponchel, and C. Vauthier, *Tuning of shell and core characteristics of chitosan-decorated acrylic nanoparticles*. Eur J Pharm Sci, 2007. **30**(2): p. 143-54.
11. Acharya, S. and S.K. Sahoo, *PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): p. 170-83.
12. Elhames, H., et al., *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles*. Oligonucleotides, 2009. **19**(3): p. 255-64.

Discussion générale

1. Introduction

Les objectifs de ce travail ont été triples. Une première partie a consisté en la sélection d'une séquence de siRNA dirigée contre la jonction EWS/Fli-1, exprimée dans les tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing (ESFT). Pour cela nous avons tout évalué plusieurs séquences de siRNA placées en divers points de la jonction EWS/Fli-1. La seconde partie a consisté en la mise en place d'immunonanoparticules de poly(isobutylcyanocrylate) pour le transport du siRNA sélectionné. Ces immunonanoparticules ont été ciblées contre les cellules du sarcome d'Ewing, caractérisées puis testées *in vitro* et *in vivo*. Enfin la dernière partie a concerné l'utilisation de l'imagerie de fluorescence *in vivo*. Nous avons utilisé un système d'imagerie de fluorescence du petit animal pour mettre au point un modèle fluorescent de sarcome d'Ewing et pour visualiser le devenir de nos nanoparticules *in vivo*. Ce projet est donc un projet pluridisciplinaire à la frontière de la biologie et de la formulation d'un système d'administration des siRNA.

2. Discussion générale

2.1. Choix d'une séquence de siRNA dirigée contre EWS/Fli-1

La première partie de ce projet a comparé l'efficacité anti-tumorale de cinq siRNA dirigés contre la région de jonction de l'ARNm EWS/Fli-1. Les études ont été menées *in vitro* sur le modèle des travaux précédemment réalisés par de Martimprey *et al.* dans le cas du cancer papillaire de la thyroïde [171]. L'efficacité de 5 séquences de

siRNA placées en différents points de la jonction EWS/FLi-1 (figure 1) a été étudiée en termes d'inhibition de l'expression du gène EWS/FLi-1 au niveau du mRNA et au niveau de la protéine mais aussi sur le plan de l'apoptose, de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire.

Précédemment les cellules utilisées dans notre équipe étaient des cellules murines transformées par l'oncogène EWS/FLi-1. Si l'insertion de EWS/FLi-1 dans les cellules NIH/3T3 est responsable de leur transformation tumorale ([25, 198] il semble que ce modèle ne soit pas un bon modèle d'étude dans le cas des ESFT car il a été montré que le profil d'expression génique en microarray des cellules NIH/3T3 exprimant EWS/FLi-1 différait de celui de cellules humaines issues des ESFT. [199]. Contrairement aux travaux précédents présentés par notre équipe sur les ESFT [120-121, 123, 152] nous avons choisi donc de travailler sur des cellules d'origine humaine.

Nous avons choisi deux lignées de cellules humaines du sarcome d'Ewing, nommées A673 et TC71.

Les cellules A673 ont été choisies car elles sont souvent utilisées dans la littérature [189, 200-203]. Les cellules A673 sont des cellules humaines que l'on pensait dérivées de patients atteints de rhabdomyosarcome primaire jusqu'à ce qu'une caractérisation plus approfondie montre qu'elles appartiennent aux ESFT [204].

Les cellules TC71 ont été choisies car ce sont des cellules humaines provenant de patients en rechute après traitement avec du cyclophosphamide, de la vincristine, de l'actinomycine et de l'adriamycine [201] et qui sont capables de former des métastases chez la souris après injection intra-veineuse [158, 205].

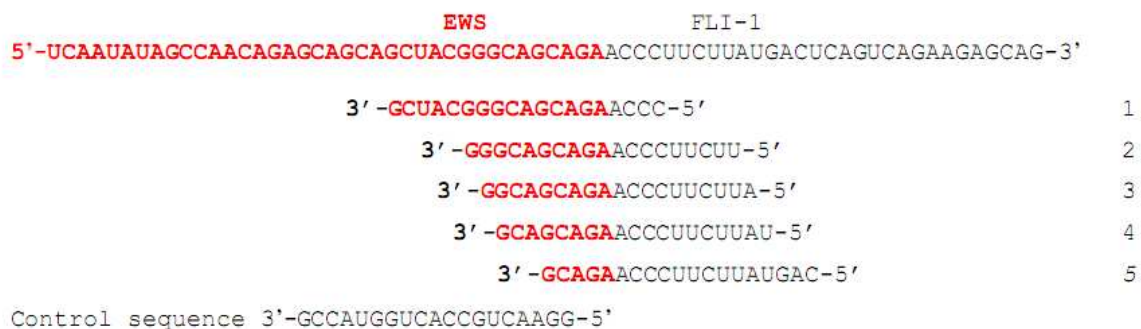


Figure 1 : Séquence de jonction EWS/Fli-1 et séquences de siRNA anti EWS/Fli-1 étudiées

Grâce aux séquences de siRNA choisies, nous avons réussi à inhiber efficacement EWS/Fli-1 au niveau de l'ARNm et au niveau protéique dans nos deux lignées, A673 et TC71. Contrairement au cancer papillaire de la thyroïde aucune séquence n'a pu être considérée comme significativement meilleure que les autres en termes d'inhibition de l'expression du gène au niveau du messenger et au niveau protéique. Contrairement à ce qui peut être trouvé dans la littérature, nous avons pu mettre en évidence une diminution de la croissance cellulaire après inhibition de EWS/Fli-1 dans les cellules A673 [206-207].

Pour tenter de discriminer les cinq séquences utilisées nous avons étudié l'effet de l'inhibition de EWS/Fli-1 sur le cycle cellulaire des cellules A673 et TC71. Nous avons montré que l'inhibition de l'expression de l'oncogène EWS/Fli-1 dans les cellules A673 conduisait à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 pour 80% des cellules mais n'avait pas d'effet sur le cycle cellulaire des cellules TC71 alors que les deux lignées A673 et TC71 présentent la même inhibition de EWS/Fli-1 au niveau du messenger et de la protéine.

Des études ont déjà montré qu'il existait une corrélation entre le niveau d'expression de EWS/Fli-1 et le taux de cycline D1 et E dans les cellules SK-N-MC et TC71.

L'expression de EWS/Fli-1 induit l'expression des cyclines D1 et E [210-211]. Zhang *et al.* ont également montré que cette régulation était liée à l'expression de EWS/Fli-1 et non au type cellulaire [210]. Il a été également montré que EWS/Fli-1 augmente l'expression de la cycline D1 dans les cellules A673 [212]. De plus, l'inhibition de EWS/Fli-1 dans les cellules TC71 conduit à une augmentation des cellules TC71 en G0-G1 [210]. Dans notre étude, l'inhibition de EWS/Fli-1 induit une accumulation des cellules A673 en phase G1 mais pas des cellules TC71. On peut supposer que la dérégulation du cycle cellulaire ne dépend pas directement ou plus de l'expression de EWS/Fli-1 dans notre lignée TC71, peut-être à cause d'un phénomène de dérive de cette lignée.

Enfin, l'effet de la transfection de siRNA sur la mort cellulaire a été étudié en observant les changements morphologiques du noyau des cellules après le traitement. Par microscopie à fluorescence des cellules A673, nous avons observé après le traitement avec le siRNA EWS/Fli-1 un changement dans la morphologie du noyau qui n'a pas été retrouvé avec le siRNA contrôle. De plus, le traitement des cellules TC71 et A673 a induit une augmentation de la mort cellulaire par apoptose par rapport aux cellules traitées avec le siRNA contrôle et aux cellules non traitées. En outre, le traitement avec le siRNA EWS/Fli-1 a provoqué l'activation des caspases dans les deux lignées A673 et TC71. Cette activation n'a pas été observée après le traitement avec le siRNA contrôle.

Le fait que le traitement par le siRNA EWS/Fli-1 ait augmenté l'apoptose suggère qu'il faudra essayer des combinaisons avec les agents qui déclenchent l'apoptose, notamment les rayonnements ionisants et les molécules cytotoxiques.

2.2. Conception d'immunonanoparticules spécifiquement dirigées contre les cellules tumorales

La deuxième partie de ce projet a consisté en la préparation d'immunonanoparticules capables de transporter les siRNA. Les siRNA sont des candidats prometteurs pour le traitement du cancer, en particulier dans les maladies telles que le sarcome d'Ewing, qui présentent une anomalie moléculaire permettant de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Cependant, ces molécules thérapeutiques sont fragiles et se dégradent rapidement dans le flux sanguin. Par ailleurs, ils ne peuvent pas passer les barrières biologiques, y compris les membranes cellulaires, en raison de leur caractère hydrophile. Il est donc nécessaire de les associer à un système de délivrance afin de leur permettre de passer ces barrières biologiques et les protéger de la dégradation. Dans ce but, l'une des stratégies utilisées actuellement est l'utilisation de nanovecteurs. Parmi tous les nanovecteurs qui ont été utilisés et dont la littérature fait état, notre équipe a précédemment utilisé avec succès des nanoparticules polymériques cœur/couronne à base de poly(isobutylcyanoacrylate) et de chitosane [170-171].

Pour améliorer l'efficacité de ces nanoparticules et diminuer les doses de siRNA et donc le coût futur et les effets néfastes d'un tel traitement chez l'homme, nous avons décidé de cibler ces nanoparticules directement vers les cellules du sarcome d'Ewing. Pour atteindre cet objectif des anticorps anti-CD99 ont été greffés sur la couronne des nanoparticules au niveau des chaînes de chitosane. L'antigène CD99, est bien connu. Il est exprimé dans le sarcome d'Ewing au niveau membranaire et est couramment utilisé comme un marqueur de diagnostic. Nous avons vérifié que les lignées cellulaires A673 et TC71 exprimaient CD99. Ainsi, ces lignées cellulaires sont adaptées à l'étude des nanoparticules ciblées contre les tumeurs du sarcome

d'Ewing. Pour fixer les anticorps à la surface des nanoparticules, nous avons choisi d'utiliser une approche avidine-biotine permettant une flexibilité dans le choix de l'anticorps greffé à l'avenir.

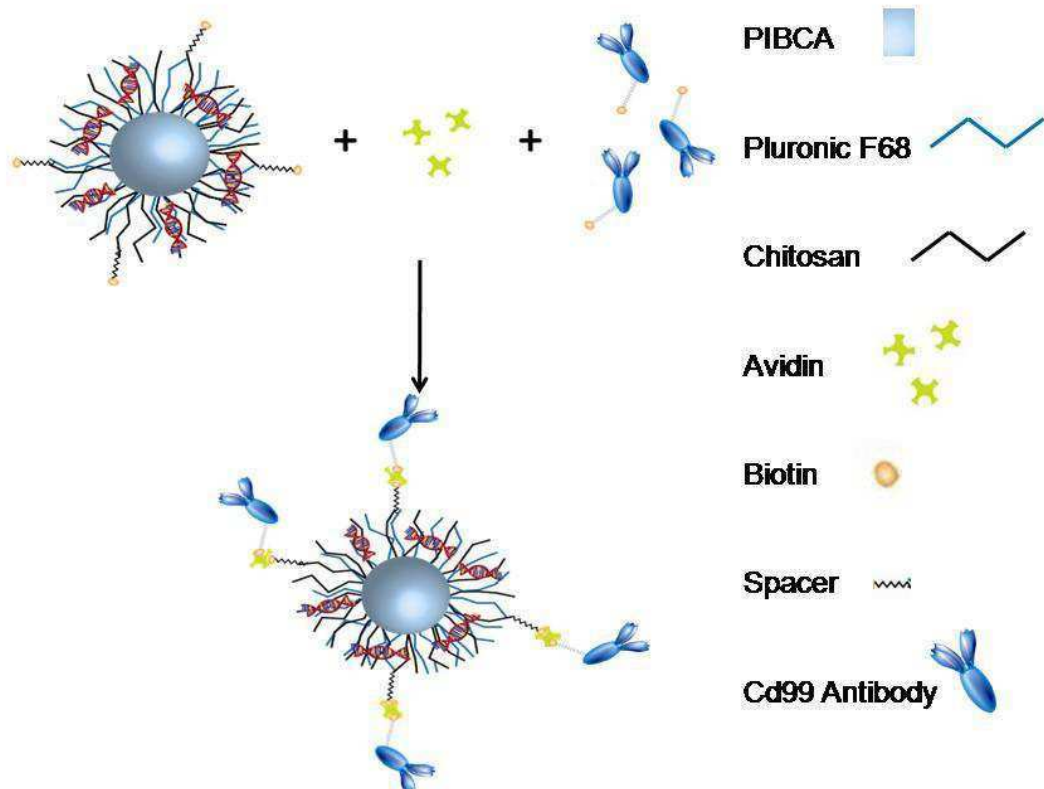


Figure 2 : Représentation schématique de la préparation des immunonanoparticules

Dans cette étude nous avons montré une biotinylation efficace de l'anticorps CD99 et une biotinylation efficace du chitosane à la surface des nanoparticules. L'association entre ces deux composés conduit à la formation de nanoparticules greffées avec l'anticorps CD99 grâce à la formation de complexes biotine/avidine (figure 2).

Nous avons évalué la capacité des nanoparticules à transporter le siRNA dirigé contre EWS/Fli-1 et montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre le taux d'adsorption de siRNA sur les nanoparticules PIBCA/chitosane et sur les nanoparticules PIBCA/chitosane biotinylées. Ces nanoparticules modifiées sont toujours de bons candidats comme nanovecteurs de siRNA. Les nanoparticules utilisées dans ce travail ont déjà été décrites pour vectoriser des siRNA à visée antitumorale *in vivo* [170-171] et des nanoparticules semblables ont été utilisées pour transporter des ODN [123]. Nous avons montré une différence dans le comportement des ODN et des siRNA du point de vue de leur association avec les nanoparticules. Le siRNA utilisé est composé de deux brins de 21 nucléotides chacun, pour un total de 42 nucléotides. L'ODN utilisé est un 30-mer, c'est-à-dire qu'il est composé de 30 nucléotides. De plus, il a la forme d'un double brin de 2 fois 11 nucléotides et une boucle composée de 8 nucléotides libres (figure 3). Cette boucle, en renforçant les interactions stériques, pourrait être la raison pour laquelle l'association avec les ODN a été moins efficace que l'association avec des siRNA. Cela montre qu'en plus de la formule linéaire ou la taille des nucléotides utilisés, il est important d'être conscient de la structure de la molécule.

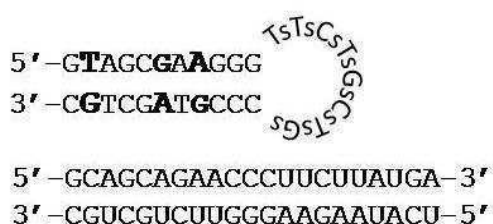


Figure 3 : Structure de l'oligonucléotide antisense (haut) et du siRNA (bas) utilisés

Par ailleurs, nous avons testé la charge de surface des nanoparticules lorsqu'elles sont associées à des siRNA avec ou sans biotine. Les variations du comportement des nanoparticules au niveau de leur potentiel zêta pourraient causer une différence de comportement *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules à l'égard de l'interaction avec les membranes cellulaires.

De plus, la toxicité des nanoparticules évaluée en MTT n'est pas influencée par la biotinylation ou par le couplage de l'anticorps de surface. Mais le type de noyau polymère utilisé semble être plus critique, l'introduction d'un polymère de méthylmetacrylate ayant augmenté la toxicité des nanoparticules préparées.

Les nanoparticules testées lors de notre étude n'ont pas montré d'activation de la protéine C3 du système du complément. En particulier, l'addition de molécules de biotine, d'avidine et d'anticorps à la surface des nanoparticules n'a pas activé le système du complément *in vitro*. Ces résultats obtenus *in vitro* ainsi que les résultats des analyses sanguines réalisées chez la souris qui n'ont montré aucune augmentation du nombre de cellules immunitaires lors du traitement permettent de supposer que les modifications de surface n'ont pas modifié les caractéristiques furtives de nos nanoparticules *in vivo*.

In vitro, l'analyse par microscopie confocale de cellules A673 traitées avec les nanoparticules PIBCA/MMA-Rhodamine/chitosane ciblées contre cd99 montre une coloration rouge de la membrane cellulaire qui n'est pas observée avec les nanoparticules non ciblées. *In vivo*, les résultats préliminaires obtenus par imagerie de fluorescence du petit animal ont indiqué que l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur était plus importante et plus rapide en utilisant des nanoparticules greffées avec des anticorps anti CD99 par rapport aux nanoparticules non ciblées. Ceci est un résultat prometteur montrant que le ciblage des nanoparticules induit une

accumulation *in vivo* des nanoparticules dans la tumeur plus efficace grâce à la reconnaissance de la protéine CD99 présente à la surface de la membrane des cellules tumorales.

Nous avons évalué la capacité des nanoparticules ciblées à inhiber EWS/Fli-1, qui est considéré comme la principale cause génétique de sarcome d'Ewing. Les résultats montrent une meilleure inhibition de EWS/Fli-1 dans les tumeurs où le siRNA a été administré en utilisant les nanoparticules ciblées contre CD99, probablement due à une plus grande quantité de siRNA transporté dans la tumeur par rapport aux nanoparticules non ciblées. A 24 jours après le traitement avec des nanoparticules non ciblées, il y a une diminution significative de la croissance tumorale dans les tumeurs traitées par rapport aux tumeurs non traitées. Ceci confirme les résultats précédemment obtenus *in vivo* avec d'autres types de nanoparticules et des oligonucléotides antisens par Elhamess *et al.* [123] sur les cellules murines exprimant l'oncogène EWS/Fli-1 humaine. Cependant, il est à noter que dans notre étude, la tumeur xénogreffée était composée de cellules humaines provenant d'un sarcome d'Ewing humain et non de cellules murines dans lequel on a exprimé artificiellement EWS/Fli-1. De plus, des expérimentation menées au sein de notre équipe avec des ODN anti-EWS/Fli-1 transportés par des nanoparticules similaire de PIBCA/Chitosane n'avaient précédemment pas permis de mettre en évidence d'inhibition de la croissance tumorale avec les cellules humaines A673 (Communication personnelle C. Malvy).

Au cours de travaux précédent, Dohjima *et al* ont utilisé deux siRNA, *in vitro* dans les cellules humaines TC135. Il a été montré que ces siRNAs, dont une séquence est très proche de celle que nous avons utilisée *in vivo* dans notre étude, n'inhibaient pas EWS [148]. Compte tenu des résultats de Villemeur *et al.* [241] et de Tanaka *et*

al. [242] sur EWS on peut cependant se demander quelle est la contribution de l'inhibition de EWS à l'effet antitumoral *in vivo* des oligonucléotides dirigés contre EWS/Fli-1.

Dans la littérature Hu-Lieskovan *et al.* ont réussi à inhiber la croissance tumorale de tumeur issues de la lignée TC71 en utilisant des nanoparticules polymères transportant des siRNA et sur lesquelles avaient été greffées des molécules de transferrine, le récepteur de la transferrine étant souvent surexprimé dans les tumeurs [217]. Cependant, deux remarques peuvent être faites sur leur travail. D'une part, leur méthode de ciblage n'est pas vraiment spécifique du sarcome d'Ewing puisqu'ils ont utilisé la transferrine et non un marqueur spécifique du sarcome d'Ewing comme dans notre travail. D'autre part, dans la partie *in vivo* de leur travail, les nanoparticules vectorisant les siRNA avaient été injectées en même temps que les cellules tumorales. De même Smith *et al.* ont utilisé l'ARN interférence pour inhiber la croissance de tumeurs chez la souris xénogreffée avec des cellules A673 mais le traitement a débuté au moment de l'implantation des tumeurs dans la mesure où les cellules injectées contenaient le vecteur permettant d'inhiber EWS/Fli-1 ou un contrôle [206]. On ne peut donc réellement parler de traitement des tumeurs mais plutôt d'une méthode permettant de limiter leur implantation. De ce point de vue le travail développé ici représente une avancée puisque les nanoparticules sont réellement ciblées vers les cellules du sarcome d'Ewing et puisque l'inhibition de la croissance tumorale est obtenue une fois que les tumeurs sont installées (taille supérieure à 50mm³).

Enfin, un paramètre essentiel dans l'utilisation de nanovecteurs étant de s'assurer de l'absence d'activation du système immunitaire nous avons vérifié *in vitro* (activation

du complément dans du sérum humain) et *in vivo* (comptage des populations de cellules immunitaires) que les nanoparticules greffées avec un système biotine/avidine n'activaient pas le système immunitaire. Nous avons donc développé un système ciblé efficace et non toxique pour délivrer des siRNA au sein de tumeurs ESFT humaines.

2.3. Utilisation de l'imagerie de fluorescence chez la souris

La dernière partie de ce projet a consisté en l'évaluation des possibilités qu'offre l'imagerie fluorescente *in vivo* à la fois dans le suivi de tumeurs et dans l'évaluation de la biodistribution de nanovecteurs. Nous avons utilisé l'imagerie *in vivo* chez la souris pour mettre au point un modèle fluorescent métastatique du sarcome d'Ewing, visualiser la régression tumorale chez l'animal et visualiser le devenir de nos nanoparticules chez la souris. Dans tous les cas nous avons choisi d'utiliser la fluorescence plutôt que la bioluminescence afin de pouvoir utiliser à terme plusieurs sondes en même temps, pour ne pas dépendre de l'injection d'un substrat dont la métabolisation peut être sujette à variations et pour bénéficier d'un temps d'acquisition plus rapide.

Dans cette partie, notre travail a porté sur l'utilisation de l'imagerie *in vivo* de fluorescence pour détecter et suivre la croissance de tumeurs. En ce qui concerne les modèles souris du sarcome d'Ewing, Hu-Lieskovan *et al.* [158] ont déjà utilisé les cellules TC71 bioluminescentes pour suivre la croissance et la régression de métastases chez la souris. Le fait d'utiliser un marqueur fluorescent à la place de la luciférase nous a permis de nous d'affranchir de l'injection d'un substrat et de réduire le temps consacré à l'acquisition des données pour chaque souris. Nous avons donc

transfecté les lignées cellulaires A673 et TC71 avec une protéine fluorescente rouge, la protéine mCherry. Les clones obtenus ont été sélectionnés et amplifiés avant de pouvoir être utilisés chez la souris. L'utilisation de la protéine mCherry présente toutefois certains inconvénients : une sensibilité inférieure à celle de la luminescence ainsi que l'existence d'une émission auto fluorescente émanant des tissus qui peut recouper le spectre de notre fluorophore. Nous avons montré que les tumeurs étaient détectables autant en sous-cutané qu'à la suite d'injections intra-veineuses. De plus, il a été possible de suivre la régression de tumeurs exprimant mCherry et situées en sous cutané. Cependant, une étude d'efficacité des nanoparticules PIBCA/Chitosane chargée en siRNA anti-EWS/Fli-1 devra être effectuée afin de vérifier que la régression tumorale est visualisable lorsque les tumeurs sont localisées en profondeur dans la souris (après injection intra-veineuse).

Cependant, l'intérêt de cette technique aurait pu se trouver dans l'étude de tumeurs sous cutanées qui semblent de tailles similaires mais dont une partie centrale aurait été nécrosée à la suite d'un traitement, ce qui n'est pas détectable par la simple mesure du volume tumoral global au pied à coulisse. Ceci permettrait de valoriser d'éventuels candidats médicaments, inefficaces si l'on se réfère uniquement au volume tumoral simple. Cependant, dans le cas du sarcome d'Ewing, du moins traité par des siRNA, très peu de zones de nécrose ont pu être observées à la fois macroscopiquement et en coupe. Ceci limite l'intérêt de cette technique dans le cas étudié, d'autant plus que l'utilisation de l'IVIS est plus couteuse, plus longue, plus fastidieuse que la mesure au pied à coulisse et nécessite l'anesthésie des animaux. Cependant, cette technique pourrait être plus utile pour évaluer le volume de tumeurs non sphériques ou très petites dont la mesure au pied à coulisse est difficile.

Enfin, la technique de l'IVIS semble prometteuse pour le suivi de la distribution de nos nanoparticules avec ou sans ciblage. L'intérêt principal de cette technique réside dans le fait que, là aussi, un suivi est possible sans avoir à sacrifier les animaux ce qui permet de s'affranchir des variations inter-individuelles. D'autre part, les techniques classiques pour réaliser ce type d'étude supposent l'injection d'un composé radio-marqué, qu'il peut être souhaitable de remplacer par une méthode plus sûre comme celle proposée. Enfin, il peut également être envisagé d'injecter plusieurs sondes fluorescences avec des spectres d'émission différents afin de suivre plusieurs parties d'un système (différents polymères le composant par exemple) ou de différencier la cinétique du système galénique de celle du produit transporté.

3. Bibliographie :

1. de Martimprey, H., et al., *siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. e2.
2. May, W.A., et al., *Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5752-6.
3. Thompson, A.D., et al., *Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells*. Oncogene, 1999. **18**(40): p. 5506-13.
4. Braunreiter, C.L., et al., *Expression of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's sarcoma*. Cell Cycle, 2006. **5**(23): p. 2753-9.
5. Elhamess, H., et al., *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles*. Oligonucleotides, 2009. **19**(3): p. 255-64.
6. Toub, N., et al., *Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma*. Pharm Res, 2006. **23**(5): p. 892-900.
7. Maksimenko, A., et al., *In vivo potentialities of EWS-Fli-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1058**: p. 52-61.
8. Maksimenko, A., et al., *Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1002**: p. 72-7.
9. Yu, Y., et al., *A humanized anti-VEGF rabbit monoclonal antibody inhibits angiogenesis and blocks tumor growth in xenograft models*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9072.
10. Teicher, B.A., et al., *Characteristics of human Ewing/PNET sarcoma models*. Ann Saudi Med, 2011. **31**(2): p. 174-82.
11. Beltran, P.J., et al., *Efficacy of ganitumab (AMG 479), alone and in combination with rapamycin, in Ewing's and osteogenic sarcoma models*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **337**(3): p. 644-54.
12. Sainz-Jaspeado, M., et al., *Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(11): p. 1489-500.
13. Houghton, P.J., et al., *Evaluation of cytarabine against Ewing sarcoma xenografts by the pediatric preclinical testing program*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(6): p. 1224-6.
14. Martinez-Ramirez, A., et al., *Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques*. Cancer Genet Cytogenet, 2003. **141**(2): p. 138-42.
15. Scotlandi, K., et al., *Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma*. J Orthop Res, 2000. **18**(6): p. 959-66.
16. Hu-Lieskovan, S., et al., *Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8984-92.
17. Smith, R., et al., *Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma*. Cancer Cell, 2006. **9**(5): p. 405-16.

18. Kowalewski, A.A., R.L. Randall, and S.L. Lessnick, *Cell Cycle Deregulation in Ewing's Sarcoma Pathogenesis*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 598704.
19. Zhang, J., et al., *Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6026-34.
20. Matsumoto, Y., et al., *Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes*. Br J Cancer, 2001. **84**(6): p. 768-75.
21. Sanchez, G., et al., *Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 6004-9.
22. de Martimprey, H., et al., *New core-shell nanoparticles for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma*. Pharm Res, 2010. **27**(3): p. 498-509.
23. Dohjima, T., et al., *Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/Fli-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line*. Mol Ther, 2003. **7**(6): p. 811-6.
24. Villemeur, M., et al., *Comparative Activity and Specificity of Antisense Oligodeoxynucleotides and Small Interfering RNA in an in vitro Ewing Sarcoma Model*. The Open Nanomedicine Journal, 2009. **2**: p. 36-45.
25. Matsunobu, T., et al., *The possible role of EWS-Fli1 in evasion of senescence in Ewing family tumors*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 803-11.
26. Hu-Lieskovan, S., et al., *EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4633-44.

Conclusion générale et perspectives

Le sarcome d'Ewing est un type de cancer très agressif et dont le pronostic reste mauvais. Les tumeurs présentent habituellement une grande diversité d'anomalies génétiques, ce qui rend la mise au point de nouveaux traitements complexe. Dans le cas du sarcome d'Ewing, il est connu que l'émergence de la maladie repose sur l'apparition d'une seule anomalie qui, dans 85% des cas, est l'oncogène de fusion EWS/Fli-1. La mise au point d'inhibiteurs d'EWS/Fli-1 semble donc être une voie intéressante dans la stratégie thérapeutique du sarcome d'Ewing. Le but de ce travail a été de concevoir et de tester un nouveau candidat-médicament pour traiter le sarcome d'Ewing qui utilise la présence d'EWS/Fli-1 au sein des cellules cancéreuses.

La première partie de ce travail a consisté en l'évaluation et en la comparaison de l'efficacité *in vitro* de cinq séquences de siRNA placées à divers endroits de la jonction. Toutes les séquences testées ont permis d'inhiber EWS/Fli-1 au niveau du messenger et au niveau protéique de manière similaire. De même les différentes séquences testées ont eu la même efficacité en termes d'effets sur le cycle cellulaire. Cependant, il faudrait maintenant évaluer l'effet de ces séquences sur la protéine EWS afin de s'assurer de la spécificité de celles-ci.

La deuxième partie de ce travail a consisté en la conception d'une formulation ciblée capable de transporter les siRNA *in vivo* chez la souris porteuse de tumeurs du sarcome d'Ewing.

Pour cela nous avons utilisé des nanoparticules composées d'un cœur de poly(isobutylcyanoacrylate) et d'une couronne de chitosan. Les siRNA étant des molécules hydrophiles chargées négativement, ils sont associés aux nanoparticules

au niveau de la couronne de chitosane. Nous avons utilisé ces nanoparticules pour développer une plateforme permettant l'association simple avec un ou plusieurs ligands biotinylés. Pour cibler les cellules du sarcome d'Ewing, notre choix s'est porté sur le marqueur de diagnostic CD99, surexprimé au niveau de la membrane cellulaire. Notre étude a montré que les modifications des nanoparticules n'entravaient ni leur capacité à transporter les siRNA ni leur tolérance *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, l'étude menée sur l'activation du complément n'a concerné que la protéine C3, qui bien qu'ayant un rôle pivot dans le déclenchement de la réponse immunitaire n'est pas la seule cible qui pourrait être étudiée [243].

In vivo l'inhibition de EWS/Fli-1 est supérieure lorsqu'on utilise des nanoparticules ciblées par rapport aux nanoparticules non ciblées. Les résultats obtenus sont donc encourageants mais une étude plus approfondie devra être réalisée avec un suivi à plus long terme des animaux afin de s'assurer qu'il n'y a pas de réponse immunitaire. L'évaluation réalisée ici devra être complétée par un dosage des anticorps et des cytokines chez les souris traitées.

De plus, l'utilisation de souris Nude irradiées dont le système immunitaire est faible a pu limiter la détection d'une éventuelle activation du système immunitaire *in vivo*. Il serait donc judicieux de prévoir une étude d'efficacité et de toxicité des nanoparticules sur des souris non immunodéprimées afin d'avoir des résultats pertinents du point de vue de leur effet sur le système immunitaire.

Enfin, la dernière partie de ce travail a été centrée autour de l'imagerie *in vivo* de fluorescence chez la souris. La mise au point d'un modèle murin fluorescent de sarcome d'Ewing permettra de mieux caractériser l'effet de notre système nanoparticules ciblées/siRNA sur les métastases, facteur essentiel dans la survie

des patients. Il est désormais également possible de suivre le devenir *in vivo* de ces nanoparticules et donc de comprendre de manière précise leur mode d'action.

Bibliographie :

1. de Martimprey, H., et al., *siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. e2.
2. May, W.A., et al., *Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5752-6.
3. Thompson, A.D., et al., *Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells*. Oncogene, 1999. **18**(40): p. 5506-13.
4. Braunreiter, C.L., et al., *Expression of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's sarcoma*. Cell Cycle, 2006. **5**(23): p. 2753-9.
5. Elhamess, H., et al., *Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles*. Oligonucleotides, 2009. **19**(3): p. 255-64.
6. Toub, N., et al., *Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-Fli1 oncogene in Ewing sarcoma*. Pharm Res, 2006. **23**(5): p. 892-900.
7. Maksimenko, A., et al., *In vivo potentialities of EWS-Fli-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1058**: p. 52-61.
8. Maksimenko, A., et al., *Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1002**: p. 72-7.
9. Yu, Y., et al., *A humanized anti-VEGF rabbit monoclonal antibody inhibits angiogenesis and blocks tumor growth in xenograft models*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9072.
10. Teicher, B.A., et al., *Characteristics of human Ewing/PNET sarcoma models*. Ann Saudi Med, 2011. **31**(2): p. 174-82.
11. Beltran, P.J., et al., *Efficacy of ganitumab (AMG 479), alone and in combination with rapamycin, in Ewing's and osteogenic sarcoma models*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **337**(3): p. 644-54.
12. Sainz-Jaspeado, M., et al., *Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(11): p. 1489-500.
13. Houghton, P.J., et al., *Evaluation of cytarabine against Ewing sarcoma xenografts by the pediatric preclinical testing program*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(6): p. 1224-6.
14. Martinez-Ramirez, A., et al., *Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques*. Cancer Genet Cytogenet, 2003. **141**(2): p. 138-42.
15. Scotlandi, K., et al., *Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma*. J Orthop Res, 2000. **18**(6): p. 959-66.
16. Hu-Lieskovan, S., et al., *Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8984-92.
17. Smith, R., et al., *Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma*. Cancer Cell, 2006. **9**(5): p. 405-16.

18. Kowalewski, A.A., R.L. Randall, and S.L. Lessnick, *Cell Cycle Deregulation in Ewing's Sarcoma Pathogenesis*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 598704.
19. Zhang, J., et al., *Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6026-34.
20. Matsumoto, Y., et al., *Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes*. Br J Cancer, 2001. **84**(6): p. 768-75.
21. Sanchez, G., et al., *Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 6004-9.
22. de Martimprey, H., et al., *New core-shell nanoparticles for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma*. Pharm Res, 2010. **27**(3): p. 498-509.
23. Dohjima, T., et al., *Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/Fli-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line*. Mol Ther, 2003. **7**(6): p. 811-6.
24. Villemeur, M., et al., *Comparative Activity and Specificity of Antisense Oligodeoxynucleotides and Small Interfering RNA in an in vitro Ewing Sarcoma Model*. The Open Nanomedicine Journal, 2009. **2**: p. 36-45.
25. Matsunobu, T., et al., *The possible role of EWS-Fli1 in evasion of senescence in Ewing family tumors*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 803-11.
26. Hu-Lieskovan, S., et al., *EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4633-44.

Annexes

Article 1

Chapter 16

Anticancer Oligonucleotides

Anne Laure Ramon and Claude Malvy

Abstract The concept of therapeutic oligonucleotides, short molecules of nucleic acids, in the cancer field mostly originates in the identification of genes critical for the development of cancers and from the capacity of automatized chemical synthesis of great quantities of oligonucleotides. These genes include not only oncogenes but also other genes implicated, for instance, in cell metabolism or apoptosis. The rationale is to inhibit these cancer-related genes with specificity and without major toxicity as frequently happens with cancer chemotherapy. Oligonucleotides have been used since 1978 in order to inhibit genes related to cancers at the mRNA level from the cellular cultures in the laboratory to preclinical trials in animals. This has been performed first with antisense oligonucleotides and since 2001 with small interfering RNAs (siRNAs). Their mechanism of action is initially based on the formation of a short Watson–Crick double helix between the mRNA strand and the complementary oligonucleotide. Processes then differ between antisense oligonucleotides and siRNAs but most of the times aim at a specific mRNA degradation or less frequently to a ribosome arrest. Clinical trials with mixed results have been performed for several years with antisense oligonucleotides and are just beginning with siRNA. The main strategy for using oligonucleotides in clinical trials has been chemical modifications which improve their resistance to degradation. But delivery by nanovectors has also been used.

Abbreviations

AUC	Area under the curve
c.i.v.i.	continuous intravenous infusion
HCMEC	Human cerebral microvascular endothelial cells
i.p.	intraperitoneal infusion
i.v.	intravenous infusion
IGF-R	Insulin growth factor receptor

C. Malvy (✉)
 CNRS UMR 8121, Vectorologie et Transfert de gènes, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif,
 France
 e-mail: claude.malvy@igr.fr

NF κ B	Nuclear factor kappa B
ODN	Oligonucleotide
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PKC- α	Protein kinase C-alpha
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	ARN interference
RNase H	Ribonuclease H
s.c.	subcutaneous infusion
SCLC	Small cell lung cancer
siRNA	small interfering RNA

Contents

16.1	Introduction
16.2	Pre-clinical Studies
16.2.1	Antisense Oligonucleotides
16.2.2	Small Interfering RNA
16.2.3	Decoys
16.2.4	Aptamers
16.2.5	Ribozymes
16.2.6	Discussion
16.3	Clinical Studies
16.3.1	Antisense Oligonucleotides
16.3.2	Small Interfering RNA
16.3.3	Ribozymes
16.3.4	Decoys
16.3.5	Discussion
16.4	Conclusion
	References

16.1 Introduction

When adequately chosen, short strands of DNA can be considered as bulky classical drugs usually under 10 kd molecular weight but designed to inhibit expression of a given gene. Antisense oligonucleotides (ODNs) and small interfering RNAs (siRNAs) are relatively new, but very promising therapeutic tools. Their target is the mRNA of this gene. They were, and still currently are, investigated as potential treatments in various cancers as targeted therapies. In this review we will deal with preclinical studies involving ODN and siRNA targeted against bcl-2, Raf kinases, Ras proteins, and protein kinase C-alpha (PKC- α). We will also describe preclinical studies performed with other short nucleic acid therapeutic molecules such as

decoys, aptamers, and ribozymes. In the second part we will describe clinical trials investigating the use of ODN, siRNA, ribozymes, and decoys in cancer therapeutics.

16.2 Pre-clinical Studies

16.2.1 Antisense Oligonucleotides

Antisense oligonucleotides (ODNs) are short DNA fragments with base sequences that complement an mRNA sequence. They can hybridize to a target mRNA and induce their specific degradation because RNA·DNA hybrids are substrates of ribonuclease H (RNase H). Therefore, they inhibit the synthesis of the protein corresponding to their complementary mRNA sequence. In vitro ODNs are delivered in cells usually after complexation with cationic lipids. Once inside the cytoplasm they enter freely into the nucleus. It is generally assumed that their interaction with mRNA in the nucleus accounts for their activity since RNase H is essentially localized in the nucleus [1]. Being nucleic acids, ODNs are fragile molecules due to their phosphodiester backbones (which can be degraded by nucleases). Therefore backbone modifiers such as phosphorothioate ODN have been used to improve their stability [2]. Antisense ODNs are widely studied compounds for therapeutic applications in many fields including cancer therapy.

16.2.1.1 Studies on *bcl-2* Proto-oncogene

The *bcl-2* proto-oncogene is overexpressed in half of human malignancies and in 50–70% of breast cancer. It can be responsible for resistance to chemotherapy, radiation, and hormone therapy-induced apoptosis. Many examples are found in literature about using ODN to counteract *bcl-2* activity in various cancers.

G3139 (Oblimersen sodium, Genasense, Genta) is a phosphorothioate antisense oligonucleotide directed against *bcl-2* mRNA, exactly on the six first codons. It was used in several preclinical studies.

Schlagbauer et al. investigated G3139 in Merkel cell carcinoma in vivo in mice. Using G3139 of 10 mg/kg for 4 weeks in intravenous infusion (i.v.), they have shown significant tumor growth reduction (mean tumor weight 0.29 ± 0.14 g SD in treated group versus 2.30 ± 0.47 g SD in saline group, which corresponds to a decrease of 88% of the tumor growth). They also demonstrated a reduction on the *bcl-2* protein after treatment and an induction of apoptosis [3]. G3139 was evaluated alone or in association with doxorubicin in vitro in two breast cancer cell lines (with or without estrogen receptor). Similar results were obtained in both cell lines. G3139 allowed reducing *Bcl-2* mRNA and protein levels at $0.8 \mu\text{M}$. G3139 also allowed reducing the number of viable cells and increasing the number of apoptotic cells. Combination of G3139 and doxorubicin increased cytotoxicity and apoptosis but did not show synergetic effects [4].

G3139 ODN was also used in vivo in immunodeficient mice bearing xenografted tumors with intraperitoneal injection (i.p.) in non-small cell lung cancer. In subcutaneous tumors, G3139 alone inhibited tumor growth at 5 and 10 mg/kg and reduced bcl-2 protein levels. Treated tumors also showed areas of necrosis and an increase in the number of dead cells. Association with vinorelbine led to potentialization of the effect on tumor growth (tumor size of vinorelbine alone was 0.42 cm³ but 0.28 cm³ with ODN 5 mg/kg and 0.15 cm³ with ODN 10 mg/kg). These results were confirmed in mice orthotropic tumors. However, while treatment with G3139 alone did not lead to long-term survivors, the combination of G3139 with vinorelbine did [5].

Duggan et al. used G3139 as well as another ODN at 5 μ M to downregulate protein expression and enhance apoptosis in human transitional bladder cell carcinoma. Nevertheless association with mitomycin did not result in increased apoptosis [6].

G3139 (0.2 μ M) also showed significant reduction in Bcl-2 protein expression and sensitization of prostate cancer cells to radiations [7].

Anai et al. evaluated the effects of G3139 antisense alone or in association with radiations in prostate cancer. In vitro, they have shown that treatment with G3139 (0–10,000 nM) produced no cytotoxic effects and resulted in a down regulation of bcl-2 protein levels (500 nM). In vitro, the combination of G3139 (500 nM) with radiations sensitized cells to radiations. In vivo, association between radiations and G3139 allowed a threefold reduction of tumor volume, a down regulation of bcl-2 protein level, an increase of apoptosis, and a decrease of cell proliferation and angiogenesis [8].

Schaaf et al. tested another phosphorothioate ODN directed against bcl-2 in vitro in several human bladder carcinoma cell lines. At 5 μ M they demonstrated a decreased expression of bcl-2 protein and a decreased cell survival (from 53.89 to 87.81% in the different cell lines). However, treatment with cisplatin (100 or 250 ng/mL) resulted in lower cell survival rates with a dose-dependant effect [9].

Kitada et al. designed an 18-mer phosphodiester oligonucleotide complementary to the first six codons of the bcl-2 mRNA. In t(14;18) non-Hodgkin's lymphoma cell lines SU-DHL-4 they managed to totally inhibit bcl-2 mRNA and to reduce bcl-2 protein levels (reduction of 84–95%) at 200 μ M [10].

Ziegler et al. studied the effects of an antisense ODN targeting bcl-2 in small cell lung cancer in vitro. They synthesized 13 different ODNs directed against various areas of bcl-2 mRNA. In SW2 cell line, they identified ODN 2009, targeting the coding region, as the most efficient one. Indeed, at 0.15 μ M, ODN 2009 caused 96% of reduction of the cell viability after 96 h and 60% reduction of bcl-2 protein levels. The reduction of cell viability was due to an increase of apoptosis [11].

Yamanaka et al. used a 2'-methoxyethoxy-modified gapmer bi-specific ODN targeting Bcl-2 and Bcl-xL, ISIS 279228 (ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA), in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells. They showed that treatment with ISIS 279228 (0.1, 0.5, or 1 μ M for 2 days) reduced Bcl-2 mRNA levels by 40, 11, or 10% of control and bcl-2 protein levels by 41, 23, and 12% of control, respectively [12].

Kausch et al. demonstrated that bcl-2 ODNs were efficient to downregulate 40% bcl-2 mRNA levels (at 250–500 nM) and bcl-2 protein expression (50% on

down regulation) in renal carcinoma. In association with cisplatin they observed an increased toxicity (IC₅₀ was 2.7 mg/ml without bcl-2 ODN and 1 mg/ml with bcl-2 ODN) and an increased level of apoptosis [13].

Zangemeister-Wittke et al. synthesized a 2'-*O*-methoxyethoxy-modified phosphorothioate bi-specific (bcl-2 and bcl-X) ODN (4625) inducing apoptosis in small cell and non-small cell lung cancer cell lines. That ODN downregulated bcl-2 mRNA (23% of the control value) and protein level (22% of the control value at 0.6 μ M) [14]. Gautschi et al. investigated that ODN on various cell lines in vitro and in vivo. In vitro, they demonstrated that bcl-2 mRNA was downregulated with a maximum inhibition of 86% at 0.9 μ M compared to control and that protein level of bcl-2 was reduced to 25% of control value in breast carcinoma cells. They also managed to inhibit tumor cell growth in lung, breast, colorectal, and prostate carcinomas as in malignant melanoma. In vivo, they induced tumor growth reduction and apoptosis in subcutaneous breast and colorectal carcinomas (intraperitoneal injection, 20 mg/kg/day for 3 weeks) [15]. In addition, Simões-Wüst et al. used that last ODN to reduce 63% bcl-2 mRNA levels, to reduce cell growth, and to induce apoptosis in MCF7 and MDA-MB-231 cells (400 and 300 nM) in breast cancer. Moreover 4625 also allowed sensitizing breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide in MCF-7 cells [16].

Reed et al. used a phosphorothioate and a phosphodiester ODN directed against bcl-2 mRNA to suppress the proliferation of human pre-B cells in acute lymphocytic leukemia in vitro. They also showed 75–95% of reduction of bcl-2 protein levels at 150 μ M. Moreover, at doses between 25 and 250 μ M, phosphorothioate antisense oligos were 5–10 times more efficient than phosphodiester antisense oligos, although their action occurred later in experiments (3–6 days versus 1–2 days) [17].

Those various examples show that bcl-2 ODNs are very efficient tools to inhibit bcl-2 mRNA and protein in vitro in a lot of tumor cell lines. Moreover they also inhibit tumor growth and induce apoptosis in vivo and in vitro. In most of the studied cancers, chemosensitization or radiation sensitization occurred while using a bcl-2 ODN combined with various drugs or radiations. Effects of bcl-2 ODN were demonstrated in a large number and variety of cancer models, in vitro as well as in vivo, showing their potential therapeutic interest in cancer treatment, hence permitting the launch of clinical trials.

16.2.1.2 Studies on Raf Kinases

Raf kinases are known to play an important role in tumor cell growth, apoptosis, and proliferation. They have been found to be upregulated in various tumors and implicated in tumor angiogenesis and metastasis. Three Raf isoforms are currently known (A, B, C also known as Raf-1 or C-Raf-1). Raf-1, which is ubiquitous, was the first to be identified [18].

Several ODN directed against Raf kinases were synthesized by ISIS pharmaceuticals and one, ISIS 5132 (ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA), was found to

be very efficient. ISIS 5312 is a 20-mer phosphorothioate ODN targeted against the 3'-untranslated region of C-Raf mRNA. It was described to efficiently decrease the level of C-Raf mRNA in lung, bladder, and colon carcinoma cells to around 90% of the control level when used at 0.2 μ M. Moreover, ISIS 5312 was found to inhibit in vivo tumor growth of lung, breast, and bladder carcinoma at around 10–20 mg/kg [19, 20]. Effects of ISIS 5312 were confirmed in lung, prostate colon, and cervical carcinomas in vitro by researchers outside ISIS pharmaceuticals. Moreover it was also shown that the effects of ISIS 5312 resulted from induction of apoptosis in treated cells [21] and in ovarian carcinoma cells [22]. Induction of apoptosis by ISIS 5312 was confirmed in vivo in lung adenocarcinoma and colon carcinoma xenografted tumors [23]. In ovarian carcinoma cells, ISIS 5312 (0.2 μ M) was found to reduce C-Raf protein levels by 50%. At 48 h, complete inhibition of C-Raf was found. Moreover, growth inhibition was reduced by 80% at 72 h and only by 30% with control ODN. Same kinds of results were found in 9/12 of the tested ovarian cells lines and ISIS 5312 also inhibited the growth of xenografted tumors [22]. ISIS 5312 was tested in combination with chemotherapy in vivo in human breast, lung, prostate, and colon carcinomas in subcutaneous tumors in nude mice (6 mg/kg/day). In human breast carcinomas ISIS 5312 resulted in additive antitumor effects when associated with adriamycin or tamoxifen. A complete inhibition of tumor growth was observed with adriamycin/ISIS 5312 combination. In small cell lung carcinoma, association with mitomycin led to complete tumor responses while association with cisplatin did not. However, both combinations resulted in superadditive effects. In large cell lung carcinoma xenografted tumors, association with mitomycin resulted in complete cures while ISIS 5312 had few effects and mitomycin alone had only a limited and temporary effect. Similar results were found for human prostate carcinomas in combination with cisplatin. In human colon carcinomas, ISIS 5312 demonstrated superadditive effects in association with cisplatin, but no complete inhibition was observed [24].

ISIS 5312 and a second-generation antisense ODN, ISIS 13650, a 2'-methoxyethyl ODN, were used in ovarian cancer. It was demonstrated that both inhibited cell growth in 15 different ovarian cancer cell lines in a range from 10 to 90% of inhibition at 0.2 μ M). They also increased apoptosis. Mullen et al. also demonstrated that growth response was associated with high proportions of Raf mRNA [25].

Moreover the 2'-O-methoxyethyl-modified ODN was found to be more efficient and had an improved antitumor activity in vivo [26].

16.2.1.3 Studies on Ras Proteins

Ras proteins are “molecular switches” that are activated when associated with GTP and inactivated when associated with GDP [27–29]. Localized at the cell membrane they play an important role in signal transmission from the membrane receptors to chromatin in the nucleus [30]. Three isoforms of Ras (H-RAS, N-Ras, and K-Ras) are expressed in mammals cells [27, 31].

Point mutations are often responsible for Ras activation [32]. Shen et al. synthesized an ODN directed against K-Ras bearing a point mutation at codon 12

AQ4

AQ5

which led to a dose-dependant inhibition of pancreatic cancer cells. Combination with insulin growth factor receptor (IGF-IR) ODN was more effective to inhibit cell growth in vitro and tumor growth in vivo in nude mice than control, K-Ras ODN or IGF-IR ODN alone. Moreover combination showed more apoptotic effect than K-Ras ODN or IGF-IR ODN alone. K-Ras mRNA and protein level were efficiently decreased by K-Ras ODN or combination of both ODN. K-Ras ODN associated with IGF-IR ODN induced apoptosis in pancreatic cancer cells [33].

It was demonstrated that an ODN directed against H-Ras efficiently inhibited the growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro, blocked the entry of treated cells in S-phase and induced apoptosis. In vivo, in pre-treated cells implanted in mice, H-Ras ODN inhibited tumor growth comparing to untreated cells. H-Ras ODN also successfully inhibited p21-H-Ras protein expression [34].

ISIS 2503 (ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA) is a 20-mer phosphorothioate ODN directed against the H-Ras in the initiation of translation region. It was found to inhibit H-Ras mRNA in T24 cells of human bladder carcinoma. Moreover, ISIS 2503 modified with 2'-methoxyethoxy (ISIS 13920) was found to be more efficient than ISIS 2503 [32].

16.2.1.4 Studies on PKC- α

Protein kinase C-alpha is part of a family of serine-threonine kinase in which there are three families. Protein kinases C (PKC) are dependant on calcium and lipid factors (like 1,2-diacylglycerol) [35].

Dean et al. screened 20 phosphorothioate ODN directed against various regions of the murine PKC- α mRNA. Those ODNs were tested for their ability to inhibit PKC- α mRNA in C127 murine cells. ISIS 4189 was found to decrease levels of mRNA by 90% in 24 h at 0.4 μ M in vitro. In vivo, ISIS 4189 decreased levels of PKC- α mRNA in liver when administered intraperitoneally [36].

ISIS 3521 (Affinitak, Aprinocarsen, ISIS pharmaceuticals Inc., Carlsbad, CA.) is a phosphorothioate ODN targeted against the 3'-untranslated region of the PKC- α mRNA. Dean et al. studied the efficacy of 20 phosphorothioate ODN directed against PKC- α mRNA in A549 lung carcinoma cells. They found that ISIS 3520 and 3522, directed to the coding region almost completely inhibited PKC- α protein synthesis. ISIS 3521 and 3527 directed against the 3'-untranslated sequences of the mRNA were relatively efficient. All four were submitted to complementary tests and results showed that ISIS 3521, 3522, and 3527 maximally inhibited PKC- α expression at 0.5 μ M. Further experiments showed that ISIS 3521 and 3527 were the most powerful ones. Indeed, they reduced expression of PKC- α mRNA by 90–95% [37].

In vivo, ISIS 3521 was studied in human breast carcinoma subcutaneous tumors (i.v., 0.6 or 6 mg/kg) and demonstrated effective dose-dependent inhibition of tumor growth [38]. ISIS 3521 was studied in many xenografted human tumor cell lines in nude mice as prostate, colon, lung, bladder, melanoma, and breast tumors. In all cell lines it demonstrated antitumor activity and more than 50% of tumor growth inhibition or even complete inhibition of tumor growth with 6 mg/kg intravenous administrations for 2–6 weeks [38].

Moreover, analogs of ISIS 3521 with 2'-modifications were found to be more stable toward nuclease degradation in human lung epithelial cells A549 [38].

In glioblastoma U-87 subcutaneous or intracranial tumors in mice, treatment with ISIS 3521 (2–20 mg/kg/day, i.p., 21 days) inhibited tumor growth. In intracranial tumors, treatment doubled the mean survival time and 40% long-term survivors were observed. In subcutaneous tumors, levels of PKC- α were reduced [39]. In glioblastoma A172 cells, ISIS 3521 reduced PKC- α levels at 0.2 μ M 24–72 h after treatment and induced apoptosis after 48 h [40].

Lin et al. also studied inhibition of PKC- α mediated by an ODN. They showed that liver orthotopic tumors over express PKC- α . Moreover, PKC- α ODN at 10 μ M led to 80% inhibition of PKC- α mRNA after 96 h. Treatment also led to cellular apoptosis and decrease of bcl-2 protein expression. The ODN (i.v., 0.4 mM, 0.5 μ l/h, 14 days) was tested in vivo in rat and inhibited growth of orthotopic tumors of 64%. Moreover, apoptosis was detected in treated tumors [41].

16.2.2 Small Interfering RNA

Small interfering RNAs (siRNAs) are short double-stranded RNA of 21–23 nucleotides that are able to specifically hybridize with a complementary mRNA and can induce its specific degradation. That mechanism is called RNA interference (RNAi). Usually most efficient siRNAs are composed of a 21-nucleotides sense strand and a 21-nucleotides antisense strand, both presenting two free nucleotides at their 3' ends [42].

According to present knowledge, large size double-stranded RNAs are intracellularly cut into smaller pieces, called siRNA (21–23 bp), by the DICER which is an RNase III. Then, a protein complex called the RNA-induced silencing complex (RISC) associates with siRNA. This complex eliminates one of the two strands (passenger strand) of siRNA and then interacts with a target RNA through complementarity of the sequence given by the conserved RNA fragment (guide strand used to guide the RISC complex). Once specifically hybridized to the target mRNA, the Argonaute 2 endonuclease (AGO2), which is associated with RISC complex, cleaves the mRNA. Cleaved siRNA will be degraded by cytoplasmic exonucleases. The RISC complex can be involved in several mRNA cleavage rounds. That last property allows for greater efficiency of the gene extinction [43]. Since their discovery in 2001 siRNAs have been extensively studied as potentially new therapeutic tools against cancer.

16.2.2.1 Studies on Bcl-2 Proto-oncogene

Akar et al. demonstrated that targeted down regulation of *bcl-2* using siRNA results in autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. Bcl-2-specific siRNA (1 μ g) downregulated bcl-2 mRNA (73% inhibition) and protein expression (75–85% inhibition) in MCF-7 breast cancer cells and induced important growth inhibition (83%) and autophagic cell death (80% of MCF-7 cells) [44].

Hao et al. found that siRNA (0.1 μ M) directed against bcl-2 mRNA caused a decrease of 80% of bcl-2 mRNA after 48 h, a decrease of 85% of bcl-2 protein

after 72 h and an increase of apoptosis in gastric cancer cells SGC-7901. They also demonstrated a decrease in cell growth in vitro and in tumor growth in vivo (measured in tumor volume) in nude mice [45]. Ocker et al. demonstrated same kind of results in silencing bcl-2 in pancreatic cancer in vitro and in vivo. At 10 nM they showed that siRNA-induced apoptosis (up to 25% in function of the siRNA sequence) after 120 h. The different siRNAs used also induced decrease levels of mRNA at 10 and 100 nM and of bcl-2 protein (after 120 h, with a siRNA concentration of 100 nM, only 24.3 and 40.9% of cells showed bcl-2-FITC signal in flow cytometry). In vivo they showed that bcl-2 siRNA was able to reduce xenografted tumor growth from 56% after daily intraperitoneal injection (200 µg/kg, 24 days) [46]. Kunze et al. also used siRNA (200 nM) directed against bcl-2 to reduce expression levels of bcl-2 mRNA and protein (down to 26% 96 h after transfection) in bladder cancer cells EJ28 [47].

16.2.2.2 Studies on Raf Kinases

Leng et al. used a siRNA-targeting Raf-1 to successfully downregulate Raf-1 mRNA (decrease of 70%), induce tumor cell apoptosis in vitro and in vivo and inhibit tumor growth in vivo (inhibition of 50–60%) in breast cancer cells MDA-MB-435. Inhibition of Raf-1 also induced reduction of the blood vessel density of the tumors when compared to control and increased apoptosis [48]. Culmsee et al. studied the effects of Raf-1 knockdown by siRNA in glioma cells (U373 and U251) and in human cerebral microvascular endothelial cells (HCMEC). In U373 and U251 cell lines Raf-1 siRNA (20 nM) showed efficient reduction of the level of mRNA and of Raf-1 protein. But this did not affect cell survival, proliferation or migration for those cell lines. In HCMEC decrease in levels of mRNA and proteins were followed by a significant decrease of cell survival (60%) and inhibition of tube formation (20% of tube formation in treated cells when compared to controls) [49].

Through those examples, Raf-1 silencing appears as a useful therapeutic strategy to inhibit tumor angiogenesis but effects of Raf-1 knockdown on tumor growth may vary with the type of considered cells.

16.2.2.3 Studies on Ras Proteins and PKC-α

Although several studies have been conducted with Ras siRNA included in plasmid constructs and one with PKC-α siRNA included in plasmid, none, as far as we know, have been conducted by direct administration of siRNA.

16.2.3 Decoys

Decoys are short double-stranded DNA molecules mimicking DNA-binding sites of proteins binding on double-stranded DNA. They have variety of binding elements for protein targets and are evaluated to inhibit promoter binding and gene expression [50].

A decoy molecule directed against the N-terminal domain of the androgen receptor has been reported to efficiently decrease tumor incidence and inhibit the growth of hormone-refractory prostate cancer (characterized by a tenfold decrease in serum levels of prostate-specific antigen and fourfold decrease in tumor volume) [51].

Decoys molecules directed against the nuclear factor κ B (NF κ B) had also been studied in cancer treatment. Azuma et al. used a decoy *cis*-element oligodeoxyribonucleic acid against NF κ B-binding site (delivered by ultrasound) in a murine colon cancer liver metastasis model. That decoy allowed to increase the sensitivity of cancer cells to paclitaxel and induced apoptosis [52].

Laguillier et al. used a hairpin NF κ B-decoy ODN (delivered using liposomes) to induce growth inhibition and cell death in tumor cell lines [53]. Gill et al. used a NF κ B-decoy ODN delivered in poly(DL-lactic-*co*-glycolic acid) microparticles in glioblastoma cells. They inhibited the nuclear translocation of NF κ B and they reduced the cell number comparing to untreated cell culture [54].

16.2.4 Aptamers

Aptamers are single or double-stranded small synthetic oligonucleotides (RNA or DNA) that can interact with proteins or other small molecules [2, 55]. They have been derived by in vitro selection from a combinatorial library of nucleic acid sequences. Like decoys, they bind their target protein with high affinity and specificity and allow inhibiting their target function [50]. Aptamers as therapeutics would bind proteins involved in the regulation and expression of genes (i.e., transcription factors) [55].

One study was reported about inducing indirect bcl-2 knockdown by a 26-mer DNA aptamer (AS1411) directed against the nucleolin, a bcl-2-binding protein in human breast cancer. At 5 μ M, it inhibited efficiently the growth of MCF-7 and MDA-MB-231 cells (with greater effects in MCF-7 cells due to greater uptake of AS1411) and induced apoptosis. Moreover, AS1411 (10 μ M) decreased the half-life of bcl-2 mRNA in MCF-7 and MDA-MB-231 cells [56].

16.2.5 Ribozymes

Ribozymes, also known as catalytic RNA, are naturally existing RNA molecules capable of sequence-specific cleavage of a target mRNA. They form duplexes with mRNA with a distorted conformation that is easily hydrolyzed. There exists several types of ribozymes but the most studied for therapeutic applications are hammerhead and hairpin ribozymes [2].

16.2.5.1 Studies on *bcl-2*

A synthetic 20'-modified hammerhead ribozyme targeting the *bcl-2* ARE region that plays a central role in the regulation of *bcl-2* gene expression was designed. This ribozyme (2 μ M) reduced both *bcl-2* mRNA (of 80% comparing to control) and *bcl-2* protein levels in a *bcl-2* over expressing Burkitt human lymphoma cell line. Moreover treatment with modified ribozyme enhanced their apoptosis [57].

A hammerhead ribozyme directed against *bcl-2* in prostate cancer was also successfully designed. However, that ribozyme was used through plasmid expression so will not be discussed in the present review [58, 59].

16.2.5.2 Studies on Ras Proteins

A 2'-allyl-Ki-Ras hammerhead ribozyme was able to decrease the mRNA levels in a concentration-dependant way (0.05–5 μ M) in colon cells with or without a point mutation on codon 12 of Ras gene. The catalytically active ribozyme also lead in a twofold higher cell growth inhibition than the catalytically inactive [60].

Scherr et al. designed two 2'-modified (2'-fluoro-2'-deoxyuridine/cytidine) hammerhead ribozymes targeted to point mutations in codon 13 of the N-Ras oncogene with increased stability. They were evaluated in HeLa cells with an N-Ras/luciferase reporter gene and showed 60% decrease in luciferase activity [61].

16.2.5.3 Studies on PKC- α

A ribozyme specific for PKC- α induced apoptotic cell death in glioma cell lines (87% compared to 5% in control cells and 30% of mutant ribozyme-treated cells). Moreover, treatment with PKC- α ribozyme resulted in a significant reduction in PKC- α (73%) and in Bcl-xL gene expression (90%). Ribozyme treatment resulted in a 90% decrease of cell proliferation whereas the mutant ribozyme resulted in a 55% decrease of cell proliferation [62]. A 2'-amino pyrimidine-modified ribozyme was tested in glioma cells and was found to be more active than unmodified ribozyme and to have an increased half-life. Glioma cells proliferation is reduced by 73% with the modified ribozyme and by 45% with the mutant form. PKC- α mRNA was reduced by 90% and PKC- α protein was reduced by 70% after treatment with modified ribozyme. Moreover a single injection of ribozyme (200 μ g) complexed with cationic lipids in tumor almost totally inhibited tumor growth while mutant ribozyme only reduced tumor growth. In treated tumor, PKC- α and bcl-XL protein levels were reduced [63].

16.2.6 Discussion

As we have previously shown in this review ODN and siRNA were the most studied compounds in all available nucleic acids used in cancer therapy. Although

many successes have been shown with ODN and siRNA, they both present several drawbacks.

16.2.6.1 Immunostimulation

ODNs have been shown to produce immunostimulatory effects through CpG sequences. Indeed CpG are recognized by toll-like receptors and by intracellular CpG-binding proteins. CpG induces macrophagic and natural killer activation, T-cells proliferation, and cytokines release. ODN with CpG sequences have been used to enhance immunity in cancer treatment [64, 65]. Concerning siRNA, it was first shown that double-stranded RNA over 30 nucleotides did produce an interferon response [66]. However, it was shown that double-stranded RNA of 21 bp can activate the protein kinase R and also induces interferon β activation. Moreover, it was found that transfection of siRNA causes activation of the interferon response by activating the Jak-Stat path and the up-regulation of genes stimulated by interferon [67]. So, unlike what was first thought, both siRNA and ODN can have immunostimulating effects which are sequence dependent.

16.2.6.2 Minimal Active Doses

In vitro, siRNAs are usually used at nanomolar doses ranging from 10 to 200 nM [45–47, 49] when ODNs are found to be effective at higher doses ranging from 200 to 900 nM [4, 6–8, 10, 12, 13, 15]. Dose on the order of 10–100 nM can be required for efficient drug activity in vivo [55]. So, when administered in human, that property of siRNA could be in favor of their use.

16.2.6.3 Selectivity and Off-Target Effects

As we have seen, siRNAs are active at low doses compared to ODNs. However, studies have demonstrated that siRNA present more off-target effects than ODN.

Off-target effects are very common and limit the specificity of siRNA hence their use for therapeutic applications. It was shown that off-target effects can involve hundreds of genes and are very difficult to eliminate and cannot be distinguished from the on-target effects of siRNA [68]. The selection of siRNA is efficient at very low doses on one hand and appropriate chemical modifications on the other might limit their off-target effects. It was also found, using a DNA array of 2059 genes, that an ODN directed against MDR1 demonstrated only 2% of off-target effects, which correspond to an off-target effect on only 37 other genes [69].

16.3 Clinical Studies

16.3.1 Antisense Oligonucleotides

Antisense oligonucleotides still constitute the great majority of clinical trials with short nucleic acids derivatives.

16.3.1.1 Clinical Trials on Bcl-2

In an early report Weeb et al. described the use of G3139 in nine patients suffering from non-Hodgkin's lymphoma. Daily doses of G3139 ranged from 4.6 to 73.6 mg/m² and were administered by subcutaneous infusion (s.c.). G3139 did not demonstrate toxic effects apart from inflammation at the injection site. Some patients demonstrated a reduction in tumor size, in the number of circulating lymphoma cells, and/or improvement of their symptoms. Moreover two of the five tested patients had a decrease in their bcl-2 protein levels [70]. Waters et al. evaluated G3139 for its pharmacokinetics and its toxicity in 21 patients with advanced bcl-2 positive non-Hodgkin's lymphoma. Patients received 14-day subcutaneous infusion of G3139 with doses between 4.6 and 195.8 mg/m²/day. At less than 110.4 mg/m²/day, G3139 showed no toxicity except inflammation at the injection site (all patients). But at higher doses, dose-dependent thrombocytopenia, hypotension, fever, and asthenia were observed and the maximum tolerated dose was 147.2 mg/m²/day (4.1 mg/kg/day). Linear correlation between steady-state concentration and dose was found (0.45 µg/mL). Concerning patient response, the study showed two minor responses, nine stable, and nine progressive diseases. Bcl-2 protein level was reduced in 13 patients in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and/or in bone marrow aspirates. On the basis of that study the phase II recommended dose was 110.4 mg/m²/day in patients with advanced non-Hodgkin's lymphoma [71].

In a Phase I trial in relapsed acute leukemia, 20 patients were evaluated with G3139 by continuous infusion (c.i.v.i.) (4–7 mg/kg/day) on days 1–10 and FLAG (fludarabine, cytarabine, and granulocyte colony-stimulating factor) chemotherapy on days 5–10. No dose-limiting side effects were observed but six complete remissions and three incomplete remissions occurred. Moreover, in 75% of patients Bcl-2 mRNA levels were downregulated. Although Waters et al. showed that maximum tolerated dose occurred at 4.1 mg/kg/day in s.c., no limiting toxicity was reported in that study even if used doses were higher and administered by intravenous injection. The steady-state concentrations were similar in both studies but the $t_{1/2}$ was found to be shorter, comparing to Waters et al., and that difference was attributed to the sustained release due to subcutaneous infusion [72].

Another phase I study was conducted in 29 untreated old patients with primary or secondary acute myeloid leukemia. Patients received G3139 (7 mg/kg/day administered with a c.i.v.i. from day 1 to 10), cytarabine (100 mg/m²/day on days 4–10),

and daunorubicin (45 and 60 mg/m²) and, after complete remission, consolidation with G3139 and high-dose cytarabine. All patients showed a reversible non-dose-limiting pancytopenia during treatment and during consolidation phase. These study show that the tested combination is safe. Moreover, data show that patient responding to the treatment had bcl-2 mRNA levels higher than non-responding ones before starting the study. It might be a clue that the antisense activity is better when bcl-2 mRNA is overexpressed [73].

In further phase II study, G3139 was evaluated in combination with gemtuzumab ozogamicin (GO) in 48 old patients in first relapse with acute myeloid leukemia. G3139 (7 mg/kg/day) was given on days 1–7 and 15–21 using a c.i.v.i. Patients also received GO (9 mg/m²) intravenously on days 4 and 18. Twenty-five percent of patients achieved a major response and the number of reported serious adverse effects was the same than with GO alone, so G3139 seems to be safe when used in combination with GO [74].

G3139 was evaluated during a phase I/II trial in 40 patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. G3139 was given by c.i.v.i. at doses from 3 to 7 mg/kg/day for 5–7 days. Recensed adverse effects were fatigue, night sweats, diarrhea, nausea, vomiting, hypokalemia, and cough, but dose-limiting adverse effects were hypotension and fever. The maximum tolerated dose was found to be 3 mg/kg/day. Concerning patients' clinical response, in 8% of the cases a partial response was achieved. Moreover, G3139 allowed reducing the splenomegaly, the hepatomegaly, the number of circulating lymphocytes, and the lymphadenopathy of more than 50% of patients. Hence, G3139 showed some activity in treatment of lymphocytic leukemia but needed to be more evaluated [75].

A randomized phase III trial in 20 patients suffering from relapsed or refractory lymphocytic leukemia was conducted with fludarabine and cyclophosphamide with or without G3139. That clinical trial, including 120 patients, showed that the combination of G3139 and fludarabine/cyclophosphamide increased the patients' response rate, especially in fludarabine-sensitive patients. Indeed, 17% of patients responded to the combination but only 7% with chemotherapy only. Moreover, survival and time to progression were also increased using G3139 [76].

Chi et al. related a phase I study using G3139 (0.6–5.0 mg/kg/day, 14 days, c.i.v.i. every 28 days) and mitoxantrone in 26 patients with hormone-refractory prostate cancer. As for Marucci et al., no dose-limiting toxicity was observed when using the combination of G3139 and mitoxantrone. Concerning clinical improvements, two patients had reductions in prostate-specific antigen above 50% and one patient had improvement in bone pain. Bcl-2 protein expression was decreased in patients with G3139 at 5 mg/kg/day [77].

Tolcher et al. described a phase I study on 20 patients with hormone-refractory prostate cancer using G3139 in combination with docetaxel. G3139 (5–7 mg/kg/day) was administered by c.i.v.i. on days 1–6 and docetaxel (60–100 mg/m²) was administered using a 1 h i.v. on day 6 every 3 weeks. The maximum tolerated doses were 7 mg/kg/day of G3139 and 75 mg/m² of docetaxel. Above those values, severe fatigue and severe neutropenia were observed. Seven of the 12 taxane-naïve patients had prostate antigen response whereas no response

was observed in taxane-refractory patients, suggesting that the combination may not be useful if used in order to reverse chemoresistance [78, 79]. Phase II study was conducted with 28 patients under the same conditions following phase I study except that G3139 was administered from day 1 to 8. Moreover the used dose corresponds to the maximum tolerated dose established from phase I study. Fifty-two percent of PSA and 33% of measurable disease responses were observed and the median survival rate was 19.8 months which corresponds to docetaxel alone. Sixty-nine percent of patients had a bcl-2 protein decrease in PBMCs after treatment with a median change of 49.9%. However, no relationship was found between a decrease in bcl-2 protein and response to therapy, time to progression, or survival. Sixty-eight percent of patients had severe neutropenia during the study [80].

Phase I clinical trial using G3139 was performed with 35 patients with various tumor types (treated with 0.6–6.9 mg/kg/day as a c.i.v.i. for 14 or 21 days). Results showed that bcl-2 antisense oligonucleotide was well tolerated (adverse effects observed were fatigue and elevation of the transaminases level in blood after 7 days of treatment). Steady-state concentrations were reached after 10 h and the half-life was 2 h. The study also demonstrates a decrease of bcl-2 protein in PBMCs during the treatment. However, no antitumor effect was observed (13 patients had stable disease during treatment. Twenty patients progressed and two were not evaluable for response) [81].

Liu et al. conducted a phase I trial on G3139 in carboplatin and paclitaxel. That trial included 42 patients with solid tumors (mostly melanoma, transitional cell, non-small cell lung, and prostate carcinomas). Concordant with others studies, predominant toxicities were hematological (thrombopenia, myelosuppression) and maximum given doses were G3139 7 mg/kg/day, carboplatin area under the curve (AUC) 6, and paclitaxel 175 mg/m². During that study six patients had partial response. Analysis found that intratumoral concentrations of G3139 were increased while Bcl-2 mRNA level was decreased in intratumoral and in PBMCs. Moreover, combination of G3139 with chemotherapeutic agents at usual doses was found to be safe and the maximum tolerated dose was not reached [82].

Another phase I trial was conducted in relapsed solid tumors (mostly Ewing's sarcoma and osteosarcoma) in 37 children, using doxorubicin (30 mg/m²/day), cyclophosphamide (500 mg/m²/day), and G3139 (3-5-7 mg/kg/day for 7 days using c.i.v.i., for every 21 days). Moreover, dexrazoxane was administered in prevention of the cardiotoxicity of the doxorubicin. Main side effects for the combination were the same as in adult studies (hematological, fever, fatigue, vomiting, hyperglycemia, elevation of transaminases) but there was also one case of dose-limiting toxicity due to elevation of serum creatinine and one due to neutropenia. The maximum tolerated dose was found to be 7 mg/kg/day of G3139 (7 days), with cyclophosphamide 500 mg/m²/day, and doxorubicin 30 mg/m²/day on days 5 and 6, followed by GCSF. During the study one patient with Ewing's sarcoma had partial response while eight patients had stable disease. Moreover 73% of the patients had a decrease in bcl-2 expression in PBMCs [83].

Moreover G3139 was evaluated in a phase I trial including 22 patients with breast cancer and other solid tumors in combination with docetaxel (35 mg/m²). G3139

(1–4 mg/kg/day) was administered by c.i.v.i. for 21 days and docetaxel was given every week (part I) or G3139 (5–9 mg/kg/day) was given by infusion for 5 days before the first dose of docetaxel and then for 48 h before the second and the third doses of docetaxel (part II). As in previous studies with G3139, adverse effects were fatigue, transaminases elevation, vomiting, and hematological side effects. Pharmacokinetic was similar to other studies; however, no dose-limiting toxicity was found even if part II was better tolerated than part I. Concerning patient response, two patients with breast cancer had objective tumor response while four patients had stable disease. Measurement of the levels of expression of bcl-2 protein in PBMNs showed that bcl-2 protein levels were reduced in some patients but that reduction was not correlated with G3139 doses or treatment duration [84].

G3139 was evaluated in a phase II study with α -interferon in 23 patients with metastatic renal cancer. The administration schedule was G3139 (7 mg/kg/day, c.i.v.i.) for 7 days and α -interferon (5 million units/m², s.c.) on days 4 and 6 of the first G3139 infusion and then three times a week. Only one patient had partial response. The main adverse effects were classical (fatigue, fever, transaminases elevation, and myelosuppression) but hyperglycemia and hypophosphatemia, attributed to G3139, were also registered. Pharmacokinetic studies showed a steady-state concentration in G3139 of 2.3 ± 0.9 μ g/ml, which is 2/3 lower than in other reported studies. Moreover, results showed no effect of G3139 on apoptosis. That study had not shown any benefit from the studied combination in renal cancer, so further studies were not conducted [85].

During a phase I study in advanced colorectal cancer, G3139 was tested in combination with irinotecan in 20 patients. G3139 (3–7 mg/kg/day) was administered by c.i.v.i. for 9 days and irinotecan (280–350 mg/m²) was administered by i.v. on day 6 every 3 weeks. As in other studies, hematological (neutropenia, lymphopenia) and non-hematological toxicities (nausea, vomiting, fever, and fatigue) were observed. Irinotecan could not be raised to 350 mg/m² due to high toxicity (neutropenia and diarrhea). Moreover, Bcl-2 protein was found to be reduced in PBMCs following treatment. Concerning clinical results, one patient experienced a partial response and ten had stable disease for 2.5–10 months. Hence, combination was found to be safe and maybe efficient. For phase II study the recommended doses were G3139 7 mg/kg/day with c.i.v.i. for 9 days in combination with irinotecan 280 mg/m² using i.v. on day 6 for every 3 weeks [86].

In a pilot trial 12 patients with refractory small cell lung cancer (SCLC) were treated with paclitaxel combined with G3139. G3139 was given by c.i.v.i. over 7 days at a fixed dose of 3 mg/kg/day. First, the dose of paclitaxel was 175 mg/m² but myelosuppression was observed so the dose was reduced to 150 mg/m². At that last dose, the combination was found well tolerated although, like in other trials, some hematological toxicity and fatigue were found. No objective responses were observed but one patient remained stable for 1 year after treatment. Moreover a suppression of bcl-2 protein was found in PBMCs [87].

G3139 was also used in a phase I clinical trial with carboplatin and etoposide (standard care for patients with SCLC) in untreated extensive-stage SCLC. For that study 16 patients received G3139 (5–7 mg/kg/day) on days 1–8 of a 21-day

cycle, with carboplatin (AUC 5–6) on day 6, and etoposide (80 mg/m²/day) on days 6–8. Dose-limiting neutropenia was the most common toxicity observed. Minimal severe non-hematological toxicities were observed. The maximum tolerated dose was found to be 7 mg/kg/day of G3139 on days 1–8 of a 21-day cycle, with carboplatin (AUC 5) on day 6, and etoposide (80 mg/m²/day) on days 6–8. That scheme was chosen for further clinical trials. Bcl-2 protein was not reduced in PBMCs. However, partial response was found in 86% of the patients, and two patients had stable disease. Unfortunately, responses were only transitory and patients had progressive disease after the study [88]. Based on the results of those phase I studies, a phase II study was conducted in 63 patients with chemotherapy-naïve extensive-stage SCLC. Patients received carboplatin and etoposide with (Arm A) or without (Arm B) G3139 according to the previously determined administration scheme. Toxicity was found to be higher in patients receiving G3139 but the difference was not significant and was attributable to a higher rate of hematological toxicity in Arm A whereas non-hematological toxicity was the same. The responses rates found were the same in both arms and the median survival was better with the standard treatment than with associated with G3139 [89].

In stage IV malignant melanoma in association with dacarbazine, 14 patients were treated intravenously or subcutaneously in daily doses of 0.6–6.5 mg/kg and with standard dacarbazine treatment. The combination was well tolerated, with no dose-limiting toxicity. Steady-state plasma concentrations of G3139 were attained within 24 h, and increased with administered dose. By day 5, daily doses of 1.7 mg/kg and higher led to a median 40% decrease in bcl-2 protein with increased tumor cell apoptosis. Six patients have shown antitumor responses [90]. Phase III randomized trial of G3139 in combination with dacarbazine was conducted in 771 chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. Patients received dacarbazine (1000 mg/m²) alone or after a 5-day c.i.v.i. of G3139 (7 mg/kg/day) for every 3 weeks. Results showed an increased mean survival time (9 months with G3139 versus 7.8 months without G3139) and an increased progression-free survival (2.6 with G3139 versus 1.6 months without G3139). The response rate was 13.5% for G3139–dacarbazine and 7.5% for dacarbazine alone, more durable (7.2% versus 3.6%) and complete (2.8% versus 0.8%) responses were observed. However, those effects were shown to be due to effects on patients with a normal serum LDH levels (a prognosis factor for melanoma) whereas no significant differences were found in G3139 plus dacarbazine and dacarbazine alone in patients with high LDH levels. Moreover serious adverse effects were more common with G3139–dacarbazine than with dacarbazine alone, more patients discontinued treatment with G3139–dacarbazine and the most important adverse effects were neutropenia and thrombocytopenia. That study showed the usefulness of G3139 associated with dacarbazine in advanced melanoma [91].

Other clinical trials are underway using G3139 – for example, a phase I/II in patients with chronic lymphocytic leukemia, a phase I study in subjects with solid tumors, a phase I study with carboplatin and etoposide in patients with untreated extensive-stage small cell lung cancer, a phase I/II trial in combination with paclitaxel in patients with recurrent small cell lung cancer, a phase I/II study in

combination with doxorubicin and docetaxel in patients with metastatic or locally advanced breast cancer, a phase II study with interferon alpha in patients with metastatic renal cell cancer. The complete list can be found in the FDA website www.clinicaltrials.gov

16.3.1.2 Clinical Trials on Raf Kinase

A pharmacokinetic study of ISIS 5132 (CGP 69846A; ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA) was first conducted in 31 patients with refractory cancers (colorectal and non-small cell lung carcinoma were the most common ones). Patients received ISIS 5132 in doses from 0.5 to 6.0 mg/kg a 2 h i.v. for 3 weeks and three times a week. The maximum tolerated dose was not determined and no dose-limiting side effects were observed. The main side effects were anemia, aPTT, fever, and fatigue. Pharmacokinetic parameters of ISIS 5132 were $t_{1/2}$ of 59.8 min. In two patients with stable disease, C-Raf mRNA level was decreased in PBMCs as long as the tumor progression was stopped [92]. In an early clinical trial on 14 patients treated with doses of ISIS 5132 from 0.5 to 6.0 mg/kg i.v. for 2 h three times a week, analysis showed that 13 had a decrease in C-Raf mRNA in PBMCs. Moreover, two patients had long-term stable disease [93]. A phase I trial with ISIS 5132 was conducted with 34 patients with various advanced solid tumors. ISIS 5132 was administered by c.i.v.i. for 21 days every 4 weeks. The doses ranged from 0.5 to 5.0 mg/kg. Although no patient had a complete response, two patients had stable diseases and one patient with an ovarian cancer had a significant response. ISIS 5132 was well tolerated up to 4.0 mg/kg/day and side effects were minimal. Moreover concentrations of 2 and 4 mg/kg/day led to 110 and 420 nM steady-state concentration [94], respectively.

Another phase I trial was conducted in 22 patients with advanced cancer but using ISIS 5132 in a 24 h i.v. infusion one time a week. The most common tumors were colon, kidneys, and gynecological related. The maximum tolerated dose was reached and was 24 mg/kg/week. At higher doses hemolytic anemia, anasarca, and acute renal failure occurred. Moreover no clinical response and no reduction in C-Raf mRNA were found even if five patients had stable disease during treatment [95]. Those four clinical trials show that the effects of ISIS 5132 could be linked to the schedule of administration.

A phase II study was conducted in 37 patients with colorectal adenocarcinomas. In that study patients received ISIS 3521 or ISIS 5132 at a dose of 2 mg/kg/day using c.i.v.i. for 21 days. Treatments were well tolerated but neither ISIS 3521 nor ISIS 5132 was able to induce a clinical response in that study [96]. Same results were shown by Tolcher et al. in hormone-refractory prostate cancer [97].

In a phase II study, 23 patients with progressive small cell or non-small cell lung cancer were treated. ISIS 5132 was administered at 2 mg/kg/day for 21 days using c.i.v.i. As previously the treatment was well tolerated but as ten progressive diseases and eight treatment failures were observed, ISIS 5132 was considered inefficient in those types of cancers and with the used doses and schedules [98].

As previously shown, in a phase I study, a woman with an ovarian cancer responded to ISIS 5132, so a phase II study was conducted in 22 patients with

epithelial ovarian cancer. ISIS 5132 was given at 4 mg/kg/day by c.i.v.i. for 21 days. As in other cases, ISIS 5132 was well tolerated. However, 75% of the patients had progressive disease when 25% had stable disease so ISIS 5132 was considered inefficient in ovarian carcinoma at the used dose [99].

Two phase I studies were reported using liposomal antisense oligonucleotide directed against C-Raf-1 (LErafAON). Rudin et al. used LErafAON in 22 patients with advanced solid tumors at 1-2-4-6 mg/kg/week. The most common pathologies were colon and lung carcinomas and sarcomas. The reported toxicities were linked to the infusion itself and were decreased using a prolonged infusion and pre-treatment. As usually oligonucleotides do not induce hypersensitivity reaction it is likely that hypersensitivity is due to the liposomal formulation. Moreover, those kinds of reaction have been previously reported with lipid formulations. Dose-limiting concentration was found to be reached at 4 mg/kg/week and thrombocytopenia occurred at 6 mg/kg/week. Concerning clinical response, any patient experienced objective response. However, five patients showed stable disease in the first evaluation and C-Raf-1 mRNA in PBMCs was reduced in 40% of the tested patients [100].

The second phase I study was reported by Dritschilo et al. In that study, LErafAON was used in combination with palliative radiotherapy in 17 patients with advanced cancers. Among those 17 patients, 13 received LErafAON daily and 4 were treated two times a week. In that study infusion-related adverse effects were found as in the first one. Among all the treated patients 33% had partial response, 33% had stable disease, and 33% had progressive disease. In patients who responded to treatment or were stable, 60% had an inhibition of C-Raf-1 mRNA and 80% had an inhibition of Raf-1 protein [101].

16.3.1.3 Clinical Trials on Ras

ISIS 2503 (Isis Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA) was evaluated during a phase I trial on 23 patients with refractory solid tumors (mostly colon and ovarian carcinomas). ISIS 2503 was administered in c.i.v.i. every day for 14 days. No dose-limiting toxicities were found and the maximum dose used was 10.0 mg/kg/day. ISIS 2503 was well tolerated. The most common side effects observed were fever, fatigue, and thrombocytopenia. Even if decreases in mRNA levels were found in PBMCs in seven of the eight tested patients, only four patients had cancer stabilization during the treatment and no partial or complete responses were found. This suggest that ISIS 2503 maybe safe and efficient in cancer treatment but should be associated with other chemotherapies [102].

Following that study, ISIS 2503 was under a phase I clinical trial in combination with gemcitabine in 27 patients with advanced solid tumors. ISIS 2503 (4 and 6 mg/kg/day) was administered using c.i.v.i. and gemcitabine (1000 mg/m²) was added on days 1 and 8 for 19 patients. For the other eight patients the dose of ISIS 2503 was administered corresponding to their ideal weight. That last dose was experienced because it appeared that ISIS 2503 distribution volume does not increase with weight in a proportional way. The tested combination was

well tolerated and common side effects were hematological (neutropenia, thrombopenia) and non-hematological (fatigue, fever, nausea, anorexia). Moreover, the study showed an effect of ISIS 2503 on the pharmacokinetic of the gemcitabine. Concerning patients' response to treatment, one partial response and disease stabilization were observed. So, the combination between ISIS 2503 and gemcitabine showed more efficiency than ISIS 2503 alone [103]. Following that studies a phase II trial of ISIS 2503 and gemcitabine was launched in patients with pancreatic adenocarcinoma at the recommended doses of 6 mg/kg/day for ISIS 2503 and 1000 mg/m² for gemcitabine. Forty-eight patients were treated in that study and among them one had complete response and four had partial responses to the treatment which corresponds to a response rate of 10% while response rate with gemcitabine alone in previous studies was 5%. Moreover, toxicity was limited and consistent with previous studies (neutropenia, thrombocytopenia, pain, anorexia, and hepatic abnormalities). The reported median survival for patients with gemcitabine alone was 5.7 months while with ISIS 2503 the median survival was 6.7 months [104].

16.3.1.4 Clinical Trials on PKC- α

ISIS 3521 (LY900003, Affinitak, ISIS Pharmaceutical, Inc, Carlsbad, CA) was evaluated in combination with cisplatin and gemcitabine during a phase I/II trial in non-small cell lung cancer. In phase I, seven patients were treated with ISIS 3521 (2.0 mg/kg/day), gemcitabine, (1000 mg/m²), and cisplatin (80 mg/m²). The adverse effects observed were neutropenia, thrombocytopenia and a case of dose-limiting toxicity which was fatigue. In two patients, treatment showed antitumor activity and in five others, stabilization was found.

In phase II, 55 patients were treated with the same combination with 1000 or 1250 mg/m² doses of gemcitabine. In that study, 36% of the patients showed responses to the treatment with gemcitabine 1000 mg/m² while 33% showed responses with gemcitabine at 1250 mg/m² [105].

In phase I/II trials of ISIS 3521 (2 mg/kg c.i.v.i. days 1–14) with carboplatin (AUC 6) and paclitaxel (175 mg/m²) in 48 patients with untreated non-small cell lung cancer, a 42% response rate was found and the median survival was 19 months and a time to progression of 6.6 months [106]. In phase III trial of ISIS 3521 in combination with carboplatin and paclitaxel under the same conditions as in phase I/II was not able to show survival prolongation versus chemotherapy alone (10 months versus 9.7 months) or increase in tumor responses (36 versus 37% overall response) in the 616 treated patients with non-small cell lung cancer [107].

ISIS 3521 (0.5–3 mg/kg/day, c.i.v.i. 21 days) was used in a phase I clinical trial in 21 patients with mostly ovarian, colon, pancreatic, or lung cancer. The maximum tolerated dose reached 2.0 mg/kg/day and dose-limiting toxicities were found at 3.0 mg/kg/day (thrombocytopenia, fatigue). There was tumor response observed in three patients, all suffering from ovarian cancer [108]. ISIS 3521 (2 mg/kg/day in

21 day c.i.v.i.) was evaluated in a phase II trial including 36 patients with advanced ovarian carcinoma (platinum sensitive or resistant). The treatment was well tolerated, however, no objective response were found in platinum sensitive patients while only one stable disease was observed in platinum resistant patients. The study also evaluated the patients' quality of life but was not able to show any improvement in that field either [109]. Same effects were observed in a phase II trial with ISIS 3521 in recurrent high-grade astrocytomas using the same protocol of administration [110].

Fourteen patients with solid refractory tumors (mostly ovarian and gastrointestinal) were treated with ISIS 3521 (6-12-18-24 mg/kg) using a 24 h c.i.v.i. Main side effects were neutropenia, hemorrhage, thrombocytopenia, headache, fatigue, fever, and nausea/vomiting. Moreover, ISIS 3521 induced dose-dependent effects on coagulation and complement activation. The maximum tolerated dose was found to be 24 mg/kg [111].

ISIS 3521 (1-1.5-2 mg/kg/day) administered with a 12 days c.i.v.i. was evaluated in a phase I clinical trial when administered in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced cancer (mostly colorectal). Main observed toxicities were neutropenia, alopecia, fatigue, mucositis, diarrhea, anorexia, nausea/vomiting, and tumor pain. No effects in coagulation indicators were assessed and the maximum tolerated dose was not reached. As for clinical outcomes, 43% of patients showed a tumor response [112].

In a phase I trial, 36 patients with advanced cancer (colon and renal carcinomas and melanoma were the most represented) received ISIS 3521 (0.15–6.0 mg/kg/day) in a 1 h i.v. three times a week for 3 weeks. Observed toxicities were usual and the treatment was well tolerated with no dose-limiting toxicities. During the treatment, two patients with non-Hodgkin's lymphoma had complete responses [113]. A phase II trial was conducted in 26 patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. ISIS 3521 was given at 2 mg/kg/day in c.i.v.i. for 21 days. The toxicities related to treatment were nausea, fever, headache, fatigue, neutropenia, and thrombocytopenia. At the end of the study, three (11.5%) patients had a partial response but no complete responses were found and ten (38.5%) patients had stable disease [114].

ISIS 3521 (2 mg/kg/day c.i.v.i. for days 1–14) was tested in a phase II clinical trial in combination with gemcitabine (1250 mg/m², days 1 and 8) and carboplatin (AUC 5 for day 1) in 36 previously untreated patients with advanced non-small cell lung cancer. The treatment was found to induce thrombocytopenia in 77.8% of the treated patients and neutropenia in 50.0% of the treated patients. Moreover other toxicities were those observed in other studies. In that trial no patient had complete response but 25% of patients had a partial response [115]. A phase III trial was conducted in 670 patients with advanced non-small cell lung cancer under the same conditions but the survival rates (10.4 months versus 10.0 months) and the responses rates (35.0% versus 28.9%) were not improved by the addition of ISIS 3521. Moreover, as in previous studies [116], severe thrombocytopenias were increased with ISIS 3521. ISIS 3521 was demonstrated to increase toxicity without increasing efficacy of chemotherapy in advanced non-small cell

lung cancer in combination with gemcitabine and carboplatin so studies were stopped [117].

16.3.2 *Small Interfering RNA*

According to FDA web site (www.clinicaltrials.gov) Calando pharmaceuticals is actually recruiting patients with solid tumors for a phase I clinical trial with its compound CALAA-01. CALAA-01 is a non-chemically modified siRNA designed to reduce the expression of the M2 subunit of ribonucleotide reductase. CALAA-01 is designed to inhibit tumor growth and/or reduce tumor size. The CALAA-01 is delivered by a polymeric nanoparticle targeted to tumor cells administered intravenously. The phase I clinical trial will determine the safety and the toxicity of the product. Moreover the maximum tolerated dose will be studied. The pharmacokinetic, immune response, and tumor response of CALAA-01 will also be characterized.

16.3.3 *Ribozymes*

As far as we know any clinical trial with a ribozyme was reported in the previous targets (PKC- α , bcl-2, Ras, or Raf) but a ribozyme directed against the vascular endothelial growth factor (Angiozyme) was studied in a phase I study in refractory tumors.

Angiozyme was administered in s.c. every day at doses of 10-30-100-300 mg/m²/day for 29 days. That study did not reach a maximum tolerated and Angiozyme was well tolerated. Moreover, 25% of the patients had stable disease for 6 months and two patients experienced minor responses [118]. In another trial, Angiozyme (100 mg/m²/day, days 8–21) was evaluated in combination with carboplatin (AUC 6, day 1) and paclitaxel (175 mg m², day 1) in patients with advanced solid tumors. In that trial, the toxicities found were neutropenia, thrombocytopenia, pain, anemia, and fatigue. Moreover the pharmacokinetic of the combination was evaluated. Concerning clinical responses, among the 12 patients included (mostly with non-small cell lung cancer and esophageal cancer), one had a complete response and the other had a partial response [118].

16.3.4 *Decoys*

One decoy was reported in a phase I clinical trial, the treatment of myeloma or breast carcinoma-related bone metastases. It is an osteoprotegerin (cytokine which inhibits osteoclasts) or a decoy receptor activator of NF- κ B (RANKL), fused to the Fc fragment of an IgG (AMGN-0007). Patients received the decoy (s.c.) or pamidronate (90 mg i.v.), an osteoclast inhibitor usually given to patients with breast cancer

bone metastasis. AMGN-0007 was well tolerated and led to comparable effects to pamidronate [119].

16.3.5 Discussion

Clinical trials on G3139, directed against bcl-2, have shown the efficiency of that compound in many different cancers. Indeed, G3139-induced tumors responds alone or in combination with chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma, acute leukemia, chronic lymphocytic leukemia, hormone-refractory prostate cancer, colorectal cancer, small cell lung cancer, melanoma, and various types of solid tumors. In some cases as in metastatic renal cancer or in small cell lung cancer G3139 was not more efficient than chemotherapy alone. Moreover, the efficiency of G3139 could be related to over-expression of bcl-2 protein or other factors in function of the treated cancer as LDH levels in melanoma.

ISIS 5132, however, had not shown the same efficiency as G3139. Indeed, in some studies few responses were obtained but in most of the conducted trials (ovarian cancer, small or non-small cell lung cancer, prostate cancer, or colorectal adenocarcinomas) ISIS 5132, alone or in combination with chemotherapy, was found inefficient. However, a liposomal formulation of a C-Raf ODN, LERafAON, was found to be more efficient. It could be proposed that the liposomal formulation allows a better accumulation of the active compound in the tumors, leading to a better efficiency.

ISIS 2503, directed against Ras, was found inefficient when alone but led to treatment responses when associated with chemotherapy.

ISIS 3521, directed against PKC- α , was evaluated in combination with various chemotherapies. In non-small cell lung cancer, administered in combination with chemotherapy, it was not efficient even if phase I studies had shown some few responses to the treatment. However, ISIS 3521 was found efficient in phase I/II clinical trials in various tumors types but, regarding the results of the phase III clinical trial in non-small cell lung cancer, it is difficult to foresee the results of the phase III trials to be performed in the future.

The side effects of all the oligonucleotides entered in clinical trials were almost the same, hematological side effects (thrombocytopenia, neutropenia) or no hematological side effects (fever, fatigue, etc.). Hence they may be related to all oligonucleotides. All were well tolerated even if some combination with chemotherapy resulted in an increased toxicity. However, in the case of G3139, lymphopenia was also found and could be linked to the dependency of lymphocytes to bcl-2 for their survival [120].

In the various clinical trials, the levels of the targeted protein could not always be found decreased and/or related to the administered doses of oligonucleotides so that point would need further investigations. Also in clinical trials the targeted protein decrease is not always associated to an antitumor effect. This might mean that targeting only one protein is possibly not enough when one knows that proteins might function within network systems.

16.4 Conclusion

For the moment, the most tested compounds in nucleic acid therapeutics are anti-sense oligonucleotides, but it is likely that others will be studied and then will enter into clinical trials.

All have shown great potent during in vitro and in vivo investigations in a wide range of cancer types. However, it is not always obvious to have the same efficiency when they are used in clinical trials even if great results have been found with some nucleic acids.

Acknowledgments The authors thank the Association Leyla for providing Anne-Laure Ramon's PhD fellowship.

References

1. Chan JH, Lim S, Wong WS (2006) Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(5–6):533–540
2. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ (2005) DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J* 7(1):E61–77
3. Schlagbauer-Wadl H, Klosner G, Heere-Ress E, et al. (2000) Bcl-2 antisense oligonucleotides (G3139) inhibit Merkel cell carcinoma growth in SCID mice. *J Invest Dermatol* 114(4):725–730
4. Chi KC, Wallis AE, Lee CH, et al. (2000) Effects of Bcl-2 modulation with G3139 anti-sense oligonucleotide on human breast cancer cells are independent of inherent Bcl-2 protein expression. *Breast Cancer Res Treat* 63(3):199–212
5. Hu Y, Bebb G, Tan S, et al. (2004) Antitumor efficacy of oblimersen Bcl-2 antisense oligonucleotide alone and in combination with vinorelbine in xenograft models of human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10(22):7662–7670
6. Duggan BJ, Cotter FE, Kelly JD, et al. (2001) Antisense Bcl-2 oligonucleotide uptake in human transitional cell carcinoma. *Eur Urol* 40(6):685–695
7. Mu Z, Hachem P, Pollack A (2005) Antisense Bcl-2 sensitizes prostate cancer cells to radiation. *Prostate* 65(4):331–340
8. Anai S, Goodison S, Shiverick K, et al. (2007) Knock-down of Bcl-2 by antisense oligodeoxynucleotides induces radiosensitization and inhibition of angiogenesis in human PC-3 prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 6(1):101–111
9. Schaaf A, Sagi S, Langbein S, et al. (2004) Cytotoxicity of cisplatin in bladder cancer is significantly enhanced by application of bcl-2 antisense oligonucleotides. *Urol Oncol* 22(3):188–192
10. Kitada S, Miyashita T, Tanaka S, et al. (1993) Investigations of antisense oligonucleotides targeted against bcl-2 RNAs. *Antisense Res Dev* 3(2):157–169
11. Ziegler A, Luedke GH, Fabbro D, et al. (1997) Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. *J Natl Cancer Inst* 89(14):1027–1036
12. Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, et al. (2005) A novel antisense oligonucleotide inhibiting several antiapoptotic Bcl-2 family members induces apoptosis and enhances chemosensitivity in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells. *Mol Cancer Ther* 4(11):1689–1698
13. Kausch I, Jiang H, Thode B, et al. (2005) Inhibition of bcl-2 enhances the efficacy of chemotherapy in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 47(5):703–709

16 Anticancer Oligonucleotides

14. Zangemeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, et al. (2000) A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res* 6(6):2547–2555
15. Gautschi O, Tschopp S, Olie RA, et al. (2001) Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 93(6):463–471
16. Simoes-Wust AP, Schurpf T, Hall J, et al. (2002) Bcl-2/bcl-xL bispecific antisense treatment sensitizes breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat* 76(2):157–166
17. Reed JC, Stein C, Subasinghe C, et al. (1990) Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 50(20):6565–6570
18. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, et al. (2007) Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1196–1212
19. Monia BP, Johnston JF, Geiger T, et al. (1996) Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-raf kinase. *Nat Med* 2(6):668–675
20. Monia BP (1999) Anti-tumor activity of C-raf antisense – correction. *Nat Med* 5(2):127
21. Lau QC, Brusselbach S, Muller R (1998) Abrogation of c-Raf expression induces apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 16(14):1899–1902
22. McPhillips F, Mullen P, Monia BP, et al. (2001) Association of c-Raf expression with survival and its targeting with antisense oligonucleotides in ovarian cancer. *Br J Cancer* 85(11):1753–1758
23. Lau QC, Achenbach TV, Borchers O, et al. (2002) In vivo pro-apoptotic and antitumor efficacy of a c-Raf antisense phosphorothioate oligonucleotide: relationship to tumor size. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12(1):11–20
24. Geiger T, Muller M, Monia BP, et al. (1997) Antitumor activity of a C-raf antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted subcutaneously into nude mice. *Clin Cancer Res* 3(7):1179–1185
25. Mullen P, McPhillips F, MacLeod K, et al. (2004) Antisense oligonucleotide targeting of Raf-1: importance of raf-1 mRNA expression levels and raf-1-dependent signaling in determining growth response in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 10(6):2100–2108
26. Monia BP (1997) First- and second-generation antisense oligonucleotide inhibitors targeted against human c-raf kinase. *Ciba Found Symp* 209:107–119; discussion 119–123
27. Datta D, Flaxenburg JA, Laxmanan S, et al. (2006) Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res* 66(19):9509–9518
28. Khosravi-Far R, White MA, Westwick JK, et al. (1996) Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation. *Mol Cell Biol* 16(7):3923–3933
29. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348(6297):125–132
30. Davie JR, Samuel SK, Spencer VA, et al. (1999) Organization of chromatin in cancer cells: role of signalling pathways. *Biochem Cell Biol* 77(4):265–275
31. Zwartkruis FJ, Bos JL (1999) Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. *Exp Cell Res* 253(1):157–165
32. Cowser LM (1997) In vitro and in vivo activity of antisense inhibitors of ras: potential for clinical development. *Anticancer Drug Des* 12(5):359–371
33. Shen YM, Yang XC, Yang C, et al. (2008) Enhanced therapeutic effects for human pancreatic cancer by application K-ras and IGF-IR antisense oligodeoxynucleotides. *World J Gastroenterol* 14(33):5176–5185
34. Liao Y, Tang ZY, Liu KD, et al. (1997) Apoptosis of human BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells released by antisense H-ras DNA – in vitro and in vivo studies. *J Cancer Res Clin Oncol* 123(1):25–33

35. Vignot S, Soria JC, Spano JP, et al. (2008) Protein kinases C: a new cytoplasmic target. *Bull Cancer* 95(7):683–689
36. Dean NM, McKay R (1994) Inhibition of protein kinase C- α expression in mice after systemic administration of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(24):11762–11766
37. Dean NM, McKay R, Condon TP, et al. (1994) Inhibition of protein kinase C- α expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J Biol Chem* 269(23):16416–16424
38. McGraw K, McKay R, Miraglia L, et al. (1997) Antisense oligonucleotide inhibitors of isozymes of protein kinase C: in vitro and in vivo activity, and clinical development as anti-cancer therapeutics. *Anticancer Drug Des* 12(5):315–326
39. Yazaki T, Ahmad S, Chahlavi A, et al. (1996) Treatment of glioblastoma U-87 by systemic administration of an antisense protein kinase C- α phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Mol Pharmacol* 50(2):236–242
40. Shen L, Glazer RI (1998) Induction of apoptosis in glioblastoma cells by inhibition of protein kinase C and its association with the rapid accumulation of p53 and induction of the insulin-like growth factor-1-binding protein-3. *Biochem Pharmacol* 55(10):1711–1719
41. Lin SB, Wu LC, Huang SL, et al. (2000) In vitro and in vivo suppression of growth of rat liver epithelial tumor cells by antisense oligonucleotide against protein kinase C- α . *J Hepatol* 33(4):601–608
42. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20(23):6877–6888
43. Kim DH, Rossi JJ (2007) Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8(3):173–184
44. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, et al. (2008) Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* 4(5):669–679
45. Hao JH, Gu QL, Liu BY, et al. (2007) Inhibition of the proliferation of human gastric cancer cells SGC-7901 in vitro and in vivo using Bcl-2 siRNA. *Chin Med J (Engl)* 120(23):2105–2111
46. Ocker M, Neureiter D, Lueders M, et al. (2005) Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer. *Gut* 54(9):1298–1308
47. Kunze D, Wuttig D, Fuessel S, et al. (2008) Multitarget siRNA inhibition of antiapoptotic genes (XIAP, BCL2, BCL-X(L)) in bladder cancer cells. *Anticancer Res* 28(4B):2259–2263
48. Leng Q, Mixson AJ (2005) Small interfering RNA targeting Raf-1 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 12(8):682–690
49. Culmsee C, Gasser E, Hansen S, et al. (2006) Effects of Raf-1 siRNA on human cerebral microvascular endothelial cells: a potential therapeutic strategy for inhibition of tumor angiogenesis. *Brain Res* 1125(1):147–154
50. Bhindi R, Fahmy RG, Lowe HC, et al. (2007) Brothers in arms: DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies. *Am J Pathol* 171(4):1079–1088
51. Quayle SN, Mawji NR, Wang J, et al. (2007) Androgen receptor decoy molecules block the growth of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(4):1331–1336
52. Azuma H, Tomita N, Sakamoto T, et al. (2008) Marked regression of liver metastasis by combined therapy of ultrasound-mediated NF kappaB-decoy transfer and transportal injection of paclitaxel, in mouse. *Int J Cancer* 122(7):1645–1656
53. Laguillier C, Hbib AT, Baran-Marszak F, et al. (2007) Cell death in NF-kappaB-dependent tumour cell lines as a result of NF-kappaB trapping by linker-modified hairpin decoy oligonucleotide. *FEBS Lett* 581(6):1143–1150

16 Anticancer Oligonucleotides

54. Gill JS, Zhu X, Moore MJ, et al. (2002) Effects of NFkappaB decoy oligonucleotides released from biodegradable polymer microparticles on a glioblastoma cell line. *Biomaterials* 23(13):2773–2781
55. Stull RA, Szoka FC, Jr. (1995) Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects. *Pharm Res* 12(4):465–483
56. Soundararajan S, Chen W, Spicer EK, et al. (2008) The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. *Cancer Res* 68(7):2358–2365
57. Luzi E, Papucci L, Schiavone N, et al. (2003) Downregulation of bcl-2 expression in lymphoma cells by bcl-2 ARE-targeted modified, synthetic ribozyme. *Cancer Gene Ther* 10(3):201–208
58. Dorai T, Olsson CA, Katz AE, et al. (1997) Development of a hammerhead ribozyme against bcl-2. I. Preliminary evaluation of a potential gene therapeutic agent for hormone-refractory human prostate cancer. *Prostate* 32(4):246–258
59. Dorai T, Goluboff ET, Olsson CA, et al. (1997) Development of a hammerhead ribozyme against BCL-2. II. Ribozyme treatment sensitizes hormone-resistant prostate cancer cells to apoptotic agents. *Anticancer Res* 17(5A):3307–3312
60. Giannini CD, Roth WK, Piiper A, et al. (1999) Enzymatic and antisense effects of a specific anti-Ki-ras ribozyme in vitro and in cell culture. *Nucleic Acids Res* 27(13):2737–2744
61. Scherr M, Grez M, Ganser A, et al. (1997) Specific hammerhead ribozyme-mediated cleavage of mutant N-ras mRNA in vitro and ex vivo. *Oligoribonucleotides as therapeutic agents. J Biol Chem* 272(22):14304–14313
62. Leirdal M, Sioud M (1999) Ribozyme inhibition of the protein kinase C alpha triggers apoptosis in glioma cells. *Br J Cancer* 80(10):1558–1564
63. Sioud M, Sorensen DR (1998) A nuclease-resistant protein kinase C alpha ribozyme blocks glioma cell growth. *Nat Biotechnol* 16(6):556–561
64. Krieg AM (2000) Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* 19(6):618–622
65. Carpentier AF (2005) Cancer immunotherapy with CpG-ODN. *Med Sci (Paris)* 21(1):73–77
66. Kim DH, Rossi JJ (2007) Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8(3):173–184
67. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, et al. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5(9):834–839
68. Jackson AL, Burchard J, Leake D, et al. (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12(7):1197–1205
69. Fisher AA, Ye D, Sergueev DS, et al. (2002) Evaluating the specificity of antisense oligonucleotide conjugates. A DNA array analysis. *J Biol Chem* 277(25):22980–22984
70. Webb A, Cunningham D, Cotter F, et al. (1997) BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 349(9059):1137–1141
71. Waters JS, Webb A, Cunningham D, et al. (2000) Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 18(9):1812–1823
72. Marcucci G, Byrd JC, Dai G, et al. (2003) Phase I and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood* 101(2):425–432
73. Marcucci G, Stock W, Dai G, et al. (2005) Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity. *J Clin Oncol* 23(15):3404–3411
74. Moore J, Seiter K, Kolitz J, et al. (2006) A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res* 30(7):777–783

75. O'Brien SM, Cunningham CC, Golenkov AK, et al. (2005) Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23(30):7697–7702
76. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, et al. (2007) Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 25(9):1114–1120
77. Chi KN, Gleave ME, Klasa R, et al. (2001) A phase I dose-finding study of combined treatment with an antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7(12):3920–3927
78. Tolcher AW, Kuhn J, Schwartz G, et al. (2004) A Phase I pharmacokinetic and biological correlative study of oblimersen sodium (genasense, g3139), an antisense oligonucleotide to the bcl-2 mRNA, and of docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10(15):5048–5057
79. Tolcher AW (2001) Preliminary phase I results of G3139 (bcl-2 antisense oligonucleotide) therapy in combination with docetaxel in hormone-refractory prostate cancer. *Semin Oncol* 28(4 Suppl 15):67–70
80. Tolcher AW, Chi K, Kuhn J, et al. (2005) A phase II, pharmacokinetic, and biological correlative study of oblimersen sodium and docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11(10):3854–3861
81. Morris MJ, Tong WP, Cordon-Cardo C, et al. (2002) Phase I trial of BCL-2 antisense oligonucleotide (G3139) administered by continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 8(3):679–683
82. Liu G, Kolesar J, McNeel DG, et al. (2008) A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic correlative study of the antisense Bcl-2 oligonucleotide g3139, in combination with carboplatin and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 14(9):2732–2739
83. Rheingold SR, Hogarty MD, Blaney SM, et al. (2007) Phase I Trial of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, combined with doxorubicin and cyclophosphamide in children with relapsed solid tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 25(12):1512–1518
84. Marshall J, Chen H, Yang D, et al. (2004) A phase I trial of a Bcl-2 antisense (G3139) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors. *Ann Oncol* 15(8):1274–1283
85. Margolin K, Synold TW, Lara P, et al. (2007) Oblimersen and alpha-interferon in metastatic renal cancer: a phase II study of the California Cancer Consortium. *J Cancer Res Clin Oncol* 133(10):705–711
86. Mita MM, Ochoa L, Rowinsky EK, et al. (2006) A phase I, pharmacokinetic and biologic correlative study of oblimersen sodium (Genasense, G3139) and irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 17(2):313–321
87. Rudin CM, Otterson GA, Mauer AM, et al. (2002) A pilot trial of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, and paclitaxel in patients with chemorefractory small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 13(4):539–545
88. Rudin CM, Kozloff M, Hoffman PC, et al. (2004) Phase I study of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, combined with carboplatin and etoposide in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22(6):1110–1117
89. Rudin CM, Salgia R, Wang X, et al. (2008) Randomized phase II Study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer: CALGB 30103. *J Clin Oncol* 26(6):870–876
90. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, et al. (2000) Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 356(9243):1728–1733
91. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, et al. (2006) Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24(29):4738–4745

16 Anticancer Oligonucleotides

92. Stevenson JP, Yao KS, Gallagher M, et al. (1999) Phase I clinical/pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *J Clin Oncol* 17(7):2227–2236
93. O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Gallagher M, et al. (1999) c-raf-1 depletion and tumor responses in patients treated with the c-raf-1 antisense oligodeoxynucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *Clin Cancer Res* 5(12):3977–3982
94. Cunningham CC, Holmlund JT, Schiller JH, et al. (2000) A phase I trial of c-Raf kinase antisense oligonucleotide ISIS 5132 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 6(5):1626–1631
95. Rudin CM, Holmlund J, Fleming GF, et al. (2001) Phase I Trial of ISIS 5132, an antisense oligonucleotide inhibitor of c-raf-1, administered by 24-hour weekly infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 7(5):1214–1220
96. Cripps MC, Figueredo AT, Oza AM, et al. (2002) Phase II randomized study of ISIS 3521 and ISIS 5132 in patients with locally advanced or metastatic colorectal cancer: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study. *Clin Cancer Res* 8(7):2188–2192
97. Tolcher AW, Reyno L, Venner PM, et al. (2002) A randomized phase II and pharmacokinetic study of the antisense oligonucleotides ISIS 3521 and ISIS 5132 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8(8):2530–2535
98. Coudert B, Anthoney A, Fiedler W, et al. (2001) Phase II trial with ISIS 5132 in patients with small-cell (SCLC) and non-small cell (NSCLC) lung cancer. A European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Early Clinical Studies Group report. *Eur J Cancer* 37(17):2194–2198
99. Oza AM, Elit L, Swenerton K, et al. (2003) Phase II study of CGP 69846A (ISIS 5132) in recurrent epithelial ovarian cancer: an NCIC clinical trials group study (NCIC IND.116). *Gynecol Oncol* 89(1):129–133
100. Rudin CM, Marshall JL, Huang CH, et al. (2004) Delivery of a liposomal c-raf-1 antisense oligonucleotide by weekly bolus dosing in patients with advanced solid tumors: a phase I study. *Clin Cancer Res* 10(21):7244–7251
101. Dritschilo A, Huang CH, Rudin CM, et al. (2006) Phase I study of liposome-encapsulated c-raf antisense oligodeoxyribonucleotide infusion in combination with radiation therapy in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 12(4):1251–1259
102. Cunningham CC, Holmlund JT, Geary RS, et al. (2001) A Phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma. *Cancer* 92(5):1265–1271
103. Adjei AA, Dy GK, Erlichman C, et al. (2003) A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 9(1):115–123
104. Alberts SR, Schroeder M, Erlichman C, et al. (2004) Gemcitabine and ISIS-2503 for patients with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II trial. *J Clin Oncol* 22(24):4944–4950
105. Villalona-Calero MA, Ritch P, Figueroa JA, et al. (2004) A phase I/II study of LY900003, an antisense inhibitor of protein kinase C-alpha, in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10(18 Pt 1):6086–6093
106. Yuen A, Halsey J, Fisher G, et al. (2001) Phase I/II trial of ISIS 3521, an antisense inhibitor of PKC-alpha, with carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:309a
107. Lynch T, Raju R, Lind M, et al. (2003) Randomized phase III trial of chemotherapy and antisense oligonucleotide LY900003 (ISIS 3521) in patients with advanced NSCLC: Initial report. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22:623
108. Yuen AR, Halsey J, Fisher GA, et al. (1999) Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 5(11):3357–3363

109. Advani R, Peethambaram P, Lum BL, et al. (2004) A Phase II trial of aprinocarsen, an antisense oligonucleotide inhibitor of protein kinase C alpha, administered as a 21-day infusion to patients with advanced ovarian carcinoma. *Cancer* 100(2):321–326
110. Grossman SA, Alavi JB, Supko JG, et al. (2005) Efficacy and toxicity of the antisense oligonucleotide aprinocarsen directed against protein kinase C-alpha delivered as a 21-day continuous intravenous infusion in patients with recurrent high-grade astrocytomas. *Neuro Oncol* 7(1):32–40
111. Advani R, Lum BL, Fisher GA, et al. (2005) A phase I trial of aprinocarsen (ISIS 3521/LY900003), an antisense inhibitor of protein kinase C-alpha administered as a 24-hour weekly infusion schedule in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs* 23(5):467–477
112. Mani S, Rudin CM, Kunkel K, et al. (2002) Phase I clinical and pharmacokinetic study of protein kinase C-alpha antisense oligonucleotide ISIS 3521 administered in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 8(4):1042–1048
113. Nemunaitis J, Holmlund JT, Kraynak M, et al. (1999) Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C-alpha, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 17(11):3586–3595
114. Rao S, Watkins D, Cunningham D, et al. (2004) Phase II study of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C alpha, in patients with previously treated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 15(9):1413–1418
115. Ritch P, Rudin CM, Bitran JD, et al. (2006) Phase II study of PKC-alpha antisense oligonucleotide aprinocarsen in combination with gemcitabine and carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 52(2):173–180
116. Vansteenkiste J, Canon JL, Riska H, et al. (2005) Randomized phase II evaluation of aprinocarsen in combination with gemcitabine and cisplatin for patients with advanced/metastatic non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 23(3):263–269
117. Paz-Ares L, Douillard JY, Koralewski P, et al. (2006) Phase III study of gemcitabine and cisplatin with or without aprinocarsen, a protein kinase C-alpha antisense oligonucleotide, in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24(9):1428–1434
118. Weng DE, Masci PA, Radka SF, et al. (2005) A phase I clinical trial of a ribozyme-based angiogenesis inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 for patients with refractory solid tumors. *Mol Cancer Ther* 4(6):948–955
119. Body JJ, Greipp P, Coleman RE, et al. (2003) A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 97(3 Suppl):887–892
120. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, et al. (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75(2):229–240

Chapter 16

Q. No.	Query
AQ1	Kindly set the genes in italic font as per the style.
AQ2	Kindly note that both bcl-2 and Bcl-2 are used in this chapter. Please advise if Bcl-2 can be changed to bcl-2 for consistency.
AQ3	Kindly check the clarity of “In t(14:18) non-Hodgkin lymphoma cell lines SU-DHL-4”
AQ4	“ISIS 5312 and a second-generation antisense ODN, ISIS 13650, a 2'-methoxyethyl ODN, were used in ovarian cancer” does not seem to be clear. Please clarify.
AQ5	Please provide the closing parenthesis in the sentence “It was demonstrated that both inhibited . . .”
AQ6	Kindly check if the usage of the term “K-Ras ODN or IGF-IR ODN alone” is correct.
AQ7	Kindly check if the word “Recensed” is an appropriate usage.
AQ8	Please be more clear with the term “3-5-7 mg/kg/day”.
AQ9	Kindly check the edit made to the sentence “For example, a phase I/II in patients. . .”
AQ10	Please be more clear with the term “1-2-4-6 mg/kg/week ”.
AQ11	Please be more clear with the term “6-12-18-24 mg/kg)”.
AQ12	Please be more clear with the term “1-1.5-2 mg/kg/day)”
AQ13	Please be more clear with the term “10-30-100-300 mg/m ² /day”

Article 2

MISE AU POINT

Vers une thérapeutique ciblée du sarcome d'Ewing par une stratégie antisens

—A.L. Ramon, C. Malvy

UMR 8121 CNRS, Institut G. Roussy, 38 rue Camille Desmoulins 94800 Villejuif, France

E-mail : Anne-laure.RAMON@igr.fr

E-mail : cmalvy@igr.fr

Résumé : La famille de cancers reliés au sarcome d'Ewing est caractérisée par une translocation entre les chromosomes 11 et 22. Ceci aboutit à un chromosome 22 remanié dans lequel est localisé un oncogène chimérique : EWS/Fli-1. La protéine EWS/Fli-1 joue un rôle important dans la transformation des cellules d'Ewing. La région de la fusion au niveau de l'ARNm codant pour EWS/Fli-1 est une cible spécifique pour des stratégies antisens. Elle n'est en effet présente que dans les cellules de la tumeur. Nous décrivons les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* selon ce principe tout d'abord avec des oligonucléotides antisens et ensuite avec des siRNAs. Finalement les perspectives pour une application clinique utilisant des molécules antisens sont discutées.

Mots clés : oligonucléotide antisens, Sarcome d'Ewing, EWS/Fli-1, siRNA

Towards an antisense targeted therapy for Ewing sarcoma

Abstract: *The Ewing sarcoma family of tumors is characterised by a translocation between chromosomes 11 and 22. This creates a rearranged chromosome 22 containing a chimeric oncogene : EWS/Fli-1. The EWS/Fli-1 protein plays an important role in the transformation of Ewing cells. The fusion region at the mRNA level coding for EWS/Fli-1 is a specific target for antisense strategies. It is indeed present only in cancer cells. We describe the *in vitro* and *in vivo* results obtained according to this idea first with antisense oligonucleotides and then with siRNAs. Finally prospects for clinical applications with antisense molecules are discussed.*

Keywords: *antisense oligonucleotide, Ewing sarcoma, EWS/Fli-1, siRNA*

1. INTRODUCTION

Environ 10 % des cancers sont caractérisés par des translocations chromosomiques. Ces translocations aboutissent à des fusions de gènes où un nouveau gène est créé qui est constitué de deux

fragments provenant chacun de l'un des deux gènes au sein desquels sont intervenues les cassures chromosomiques. Ce nouveau gène aussi appelé oncogène de fusion est souvent considéré comme responsable du cancer au sein duquel il a été identifié. Ces gènes sont notamment trouvés dans des leucémies et des sarcomes. Ces oncogènes de fusion peuvent soit coder pour un facteur de transcription soit pour un gène contribuant à l'activation de facteurs de transcription. Ils représentent une cible intéressante au plan thérapeutique tout d'abord en tant qu'oncogènes et aussi car leur structure particulière fait qu'ils ne se trouvent que dans les cellules cancéreuses et pas dans les cellules normales. Ils offrent donc un facteur de spécificité que l'on ne retrouve pas au plan des oncogènes dans la majorité des cancers.

Les cancers de la famille du sarcome d'Ewing (CFSE) appartiennent à ce type de cancer caractérisé par une translocation chromosomique. Ils ont été décrits il y a environ 80 ans et comportent le sarcome osseux d'Ewing, le sarcome des tissus mous, le cancer d'Askin, les tumeurs neuroectodermiques primitives périphériques osseuses ou des tissus mous. Le sarcome d'Ewing vient au second rang des cancers osseux par sa fréquence [1]. Il touche fréquemment des os plats tels que le pelvis et les côtes. Il touche aussi les os des bras et des jambes. Il s'étend de façon commune aux poumons et à la moelle osseuse. Le taux d'incidence chez les enfants (<15 ans) est estimé à 3 pour 1 million chez les caucasiens avec une prépondérance masculine de 1.5/1 [2, 3]. Le taux d'incidence chez les adultes est moins bien documenté. Un taux annuel d'incidence de 2,4 cas pour 1 million de patients âgés de 15 à 24 ans a été rapporté dans le nord de l'Angleterre [4]. L'âge médian au diagnostic se situe entre 10 et 20 ans, soit la moitié des cas. Il n'y a pas de maladies associées connues et l'origine est restée longtemps inconnue [5]. Cependant il a récemment été montré que le sarcome d'Ewing a pour origine les cellules souches mésenchymateuses [6]. La caractéristique génétique des sarcomes d'Ewing est la présence de la translocation t(11;22)(q24;q12), présente dans 85% des cas, ce qui entraîne la présence de l'oncogène de fusion *EWS/Fli-1* et en conséquence celle d'une protéine chimérique EWS/Fli-1. Des transcrits *EWS/ERG* sont également trouvés.

Plusieurs formes alternatives de EWS/Fli-1 existent en raison de variations dans les sites génomiques des cassures au sein de EWS et de FLI-1. La forme la plus commune (~ 60% des cas) [1], le type 1, consiste dans les 7 premiers exons de EWS joints aux exons 6-9 de FLI-1. La fusion de type 2 EWS/Fli-1 inclut également l'exon 5 de FLI1 et est présente dans 25% des cas. D'autres jonctions ont été décrites. Deux publications peuvent être lues pour avoir une idée claire de la structure [1] et de la fréquence [7] des différents types de jonction.

La protéine EWS/Fli-1 est un facteur de transcription aberrant qui selon différents auteurs régule de nombreux gènes et voies de signalisation telles que l'IGF-1 [8-10] ainsi que le cycle cellulaire mais aussi différentes cibles impliquées dans le développement tumoral dont les gènes NKX2-2 [11] et DAX-1 [12, 13]. Il a été ainsi montré que quand EWS/Fli-1 est inhibé spécifiquement par un court ARN interférant (RNAi) dans des cellules d'Ewing A673, 80 gènes sont trouvés activés et inhibés d'un facteur au moins 2. La protéine EWS/Fli-1 est de façon générale considérée comme la cause principale du sarcome d'Ewing. L'inhibition de cette activité protéique est donc très attrayante au plan thérapeutique. Plusieurs rapports indiquent que l'inhibition de la synthèse de la protéine EWS/Fli-1 conduit à l'inhibition de la croissance cellulaire [14-17] et au rétablissement de l'apoptose [14-18].

2. OBJET DE L'ETUDE

La séquence nucléique de la jonction n'est présente que dans l'ARNm des cellules tumorales. Cette jonction est donc une cible extrêmement attrayante pour une thérapie sélective du sarcome d'Ewing. A notre connaissance il n'y a pas eu de tentative pour cibler la fusion au niveau de l'ADN ou du transcrit primaire. Ce serait d'ailleurs difficile car les points de jonction sont introniques et variables d'un patient à l'autre. Des séquences de jonction de catégories définies n'apparaissent en effet qu'après l'épissage au niveau de l'ARN messager. Par contre l'objet de cette étude est l'utilisation de stratégies antisens pour inhiber EWS/Fli-1 au niveau de l'ARN. Nous analyserons les résultats obtenus avec des ON soit des oligonucléotides antisens (ONA) soit des petits ARN interférants (siRNA). Ces ON sont conçus pour inhiber soit EWS/Fli-1 soit d'autres gènes impliqués dans la maintenance du phénotype transformé des cellules d'Ewing. De nombreux essais cliniques ont été et sont menés avec des ONA et plus récemment avec des siRNA. Le sarcome d'Ewing est un cancer certes rare mais agressif et touchant majoritairement des enfants. Si on prend en compte que la protéine responsable présumée de ce cancer peut être inhibée par des stratégies antisens, on peut considérer que les malades devraient bénéficier d'une approche antisens au plan thérapeutique.

Les ONA appartiennent à deux catégories selon leurs modifications chimiques. Le premier type [19], tels que les ONA phosphorothioates, fonctionne en induisant la coupure de l'ARNm de façon séquence spécifique soit au niveau du transcrit ARN primaire (avant épissage) soit au niveau de l'ARNm mature. Pour la plupart des ONA décrits dans la littérature et ayant des cibles exoniques on ne sait pas vraiment auquel des deux niveaux ils agissent. La coupure de la cible est obtenue par l'action de la

RNase H, enzyme exprimée de façon ubiquitaire dans toutes les cellules répliquant de l'ADN. Après la coupure l'ONA est disponible pour entraîner la coupure d'autres molécules d'ARNm. Le second type, tels que les ONA morpholinos [20, 21], fonctionne en inhibant la traduction. Cependant, le temps de vie dans les cellules des ONA est limité, principalement à cause de l'action d'exonucléases dégradant l'ADN par l'extrémité 3'. Les dernières générations d'ONA comportent une partie sensible à la RNase H, par exemple en phosphorothioate, encadrée par des parties résistantes à la dégradation telles que 2'ethoxymethoxy ou acides nucléiques de type locked.

Les siRNA sont des ON de type ARN en double brin. La partie duplex a une longueur de 19 bases et chaque ON du duplex se termine en 3' par 2 bases flanquantes non appariées. Ils induisent une coupure séquence spécifique de l'ARNm dans le cytoplasme en dirigeant le complexe de coupure induit par l'ARN (RISC) vers la séquence complémentaire du brin antisens du siRNA au niveau de l'ARNm. Les siRNA comme les ONA peuvent être chimiquement modifiés pour augmenter leur résistance à la dégradation et augmenter leur spécificité. Des siRNA peuvent aussi être synthétisés directement dans la cellule après maturation d'un court ARN en épingle à cheveu (shRNA) qui est exprimé à partir d'un plasmide sous le contrôle du promoteur d'une ARN polymérase II ou III. Les shRNA artificiels ont une structure qui ressemble à celle des micro ARN qui eux sont naturels (miRNA), et qui inhibent la traduction et jouent un rôle important dans le développement embryonnaire. La maturation des shRNA peut produire des siRNAs (qui dégradent la cible ARNm) ou des miRNA. Il y a beaucoup de revues sur l'interférence ARN (voir [22, 23] pour des revues sur siRNA, shRNA et miRNA).

3. MÉTHODES ET DESCRIPTIF DES TRAVAUX.

3.1. Résultats obtenus avec des oligonucléotides antisens.

Les deux rapports initiaux par Tanaka *et al.* [16] et Toretsky *et al.* [17] utilisant des ONA datent de 1997. Ils traitent de plusieurs lignées de Ewing en culture, de cellules SKNMC *in vivo* [16] et de cellules TC32 [17]. Les deux publications traitent d'ONA ciblant une jonction EWS/Fli-1 de type 1. Tanaka *et al.* utilisent des phosphorothioates. Ils les ajoutent aux cellules sans agent de transfection. Les concentrations utilisées étaient donc dans la gamme des micromolaires. Un ONA ciblant la séquence de jonction était efficace pour inhiber la croissance de cellules SKNMC *in vitro*. Cependant les ONA utilisés pour les autres lignées cellulaires ainsi que *in vivo* pour les tumeurs obtenues par greffe de cellules SKNMC étaient ciblés contre la partie EWS de EWS/Fli-1. En conséquence ils induisaient à la fois l'inhibition de la synthèse des protéines EWS/Fli-1 et EWS. Ils ont obtenus une inhibition de la croissance de la tumeur à une dose totale de 187 mg/Kg. Dans l'article de Toretsky *et al.* les ON sont de type phosphodiester protégés en 3' et 5' par un groupement thioate. L'électroporation est utilisée pour les faire pénétrer dans les cellules. Plusieurs ONA ciblant la jonction sont étudiés et l'un d'entre eux, ciblant la jonction de type 1, réduit la concentration de la protéine EWS/Fli-1 dans les cellules. Cependant, et de façon inattendue, la protéine EWS exprimée par le chromosome 22 non transloqué est aussi inhibée.

Une inhibition de croissance cellulaire est observée que les auteurs attribuent à l'inhibition de *EWS/Fli-1* car l'inhibition de *EWS* par le même ONA dans des cellules PC-3M qui ne présentent pas de fusion n'induit pas d'inhibition de croissance cellulaire. Il a été confirmé par ailleurs que l'inhibition de *EWS* par des ONA n'est pas létale pour des cellules Hela [24]. Cependant ces résultats doivent être interprétés avec précaution car la fonction cellulaire de *EWS*, exprimé de façon ubiquitaire au niveau des cellules souches, n'est pas connue. Il a été rapporté que les protéines *EWS/Fli-1* et *EWS* peuvent former des hétérodimères [25]. L'inhibition concomitante de *EWS/Fli-1* et de *EWS* peut donc avoir un effet coopératif concernant l'action de *EWS/Fli-1*. Cependant si on considère le modèle des cellules NIH/3T3 exprimant *EWS/Fli-1*, l'inhibition de *EWS* n'est pas souhaitable [26]. L'oligonucléotide phosphorothioate de 25 bases décrit par Tanaka *et al.* [16] a aussi été utilisé *in vivo* par Lambert *et al.* [27] en utilisant des xénogreffes de souris obtenues à partir de cellules NIH/3T3 transformées par *EWS/Fli-1*. Cet ONA cible la fusion de type 1 tout en s'hybridant de façon plus forte à la partie *Fli-1* de *EWS/Fli-1*. Lambert *et al.* l'ont encapsulé dans des nanocapsules polymériques qu'ils ont injectées directement dans les tumeurs exprimant *EWS/Fli-1*. Ils ont observé une inhibition de 70% de la croissance tumorale à la dose de 5 mg/kg avec l'ONA et pas d'inhibition avec l'oligonucléotide contrôle. Aucune inhibition n'a été non plus observée en utilisant l'ONA non encapsulé. Avec le même modèle tumoral Maksimenko *et al.* ont utilisé un ONA de 30 bases également dirigé contre la jonction de type 1. Cet ONA a une affinité plus forte pour *EWS* que pour *Fli-1*. Le calcul montre qu'il doit avoir une structure en tige boucle, la tige étant constituée de 22 nucléotides en phosphodiester (comprenant 5 nucléotides non complémentaires de la cible mais servant à la stabilisation de la cible et à sa protection contre la dégradation) et d'une boucle de 8 phosphorothioates pour le protéger de l'attaque par les nucléases simple brin [28]. Il a été montré que cet ONA agit bien comme un antisens, inhibant *EWS/Fli-1* de 50 % après ajout en présence de lipides cationiques à des cellules NIH 3T3 exprimant de façon stable *EWS/Fli-1* [29]. L'inhibition de l'ARNm de *EWS* est alors de l'ordre de 10% [A. Maksimenko, communication personnelle]. Après fixation à des nanosphères polymériques recouvertes d'un composé cationique le cetyltriméthylammoniumbromide (CTAB), cet oligonucléotide inhibe aussi la croissance tumorale après administration intratumorale. A la même dose d'oligonucléotide (5 mg/kg) l'inhibition obtenue est légèrement meilleure que celle obtenue en utilisant le 25 mer phosphorothioate encapsulé [30]. Ce résultat est intéressant car il signifie que quoique l'utilisation *in vivo* du vecteur polymérique soit requise, l'effet obtenu est similaire bien que l'oligonucléotide et le système de vectorisation soient différents. Il semble donc qu'il y ait une sensibilité intrinsèque à l'action *in vivo* des oligonucléotides ciblés contre *EWS/Fli-1* dans ce modèle murin. L'ONA tige-boucle fixé aux nanosphères polymériques n'inhibe pas spécifiquement la croissance cellulaire en culture [29] ; cependant, il inhibe l'expression de *EWS/Fli-1* en culture cellulaire avec spécificité (A. Maksimenko, communication personnelle). Il semble donc que l'inhibition de *EWS/Fli-1* soit un élément déterminant pour obtenir un effet antitumoral par administration intra-tumorale. Par la suite

ces ONA fixés sur des nanoparticules ont été montré comme actifs par voie intraveineuse [29]. Elhames *et al.* ont notamment montré que la délivrance d'un oligonucléotide antisens par des nanoparticules PolyIsoHexyCyanoAcrylate-Chitosane (PIHCA/Chitosane) par voie systémique permettait d'inhiber la croissance tumorale chez la souris de manière spécifique (25% d'inhibition à 120mg/kg) [31]. Il est connu que les ONA, une fois dans le cytoplasme, sont rapidement transloqués dans le noyau [32, 33] où la RNase H est présente. Ainsi on pourrait les destiner à agir sur le transcrit primaire non épissé. Théoriquement le ciblage de la région intronique de jonction du transcrit primaire nucléaire peut permettre d'empêcher la résistance à l'oligonucléotide dans la tumeur en sélectionnant des cellules qui ont un épissage alternatif [34]. Cependant cette jonction varie de malade à malade. Il faudrait donc alors personnaliser l'oligonucléotide pour chaque patient. Cela paraît difficile et à notre connaissance ceci n'a jamais été essayé.

3.2. Résultats obtenus avec des siRNAs

3.2.1. Culture cellulaire

Jusqu'à maintenant on pense que l'activité inhibitrice des siRNAs est localisée dans le cytoplasme où est localisé le complexe RISC. La jonction *EWS/Fli-1* au niveau de l'ARNm est évidemment aussi une cible intéressante pour les siRNAs. Dohjima *et al.* [9] ont étudié l'action de deux siRNAs exprimés de façon intracellulaire à partir de shRNA et dirigés contre une jonction de type 1 dans des cellules TC135. L'un des deux siRNAs a aussi partiellement inhibé *Fli-1*. Les deux siRNAs ont entraîné la dégradation de 80 % leur cible ARNm (ce qui confirme leur activité siRNA) et réduit la croissance cellulaire de 50-60%. Siligan *et al.* [35] ont utilisé des siRNAs exprimés à partir de shRNA dans 3 lignées différentes de sarcome d'Ewing : STA-ET-7.2, SK-N-MC et TC52, l'un ciblant la région de la jonction de type 1 (identique à la séquence de Dohjima *et al.*), un autre celle de type 2 et un troisième la partie *Fli-1* de la jonction. Quand ils sont exprimés intra cellulièrement à partir de shRNA inclus dans un vecteur rétroviral sous promoteur transcrit par la RNA polymérase III, tous les trois inhibent spécifiquement l'expression de *EWS/Fli-1* en induisant la dégradation de l'ARNm. Ils inhibent également la croissance de cellules d'Ewing en culture monocouche et en agar mou. Chansky *et al.* [18] ont également utilisé un siRNA dirigé contre la jonction de type 2 dans des cellules SK-ES. Cependant ce siRNA n'est pas efficace. Ils ont observé l'inhibition de *EWS/Fli-1* par un siRNA électroporé dirigé contre la partie *Fli-1*. *Fli-1* n'est pas exprimé dans les cellules SK-ES-1 au niveau protéique. Les conséquences pour les cellules SK-ES-1 sont une augmentation de l'apoptose et une inhibition de l'invasivité dans un essai *in vitro*. Prieur *et al.* [15] ont utilisé un siRNA ciblant la jonction de type 1. Ce siRNA a une cible localisée entre les cibles choisies par Dohjima *et al.* [14] (Figure 1). Ce siRNA synthétique a été transfecté avec l'oligofectamine dans des cellules A673. Il a été alors utilisé, grâce à la technique des microarray, pour identifier les gènes régulés par *EWS/Fli-1*. Ce siRNA induit dans les cellules A673 après deux transfections un arrêt complet de la croissance et une augmentation très importante du nombre de cellules apoptotiques.

EWS	POINT DE JONCTION	FLI-1	
	↓		
	5'UCAAUUAGCCAACAGAGACAGCUACGGGCAGCAGA	ACCCUUCUUAUGACUCAGUCAGAAGAGCAG 3'	(1)
	GCAGCUACGGGCAGCAGA	ACCCUUC	(2)
		GCAGAACCCUUCUUAUGACUCAGUC	(3)
ANTISENS		AGCAGAACCCUUCUUAUGAC	(4)
	CAGCUACGGGCAGCAGA	ACCCUUC	(5)
		AGCAGAACCCUUCU	(6)
	UACGGGCAGCAGA	ACCCUUCUUAUG	(7)
		GGCAGCAGAACCCUUCUUA	(8)
siRNA	AGCUACGGGCAGCAGA	ACCC	(9)
		AGCAGAACCCUUCUUAUGAC	(10)
	CAGCUACGGGCAGCAGA	ACCC	(11)
		GCAGAACCCUUCUUAUGAC	(12)

Figure 1 : Séquences mRNA cibles utilisées dans la littérature.

(1) Point de jonction de l'ARNm de EWS/Flt-1 ; (2) Maksimenko *et al* [28] ; (3) Tanaka *et al* [16], Lambert *et al* [27] ; (4) Toretzky *et al* [17] ; (5) Toretzky *et al* [17] ; (6) Toretzky *et al* [17] ; (7) Tanaka *et al* [16] ; (8) Prieur *et al* [15] ; (9) Dohijma *et al* [14] ; (10) Dohijma *et al* [14] ; (11) Toub *et al* [41] ; (12) Siligan *et al* [35].

Il est difficile de tirer des conclusions générales de ces expériences avec les siRNA car les séquences ainsi que les protocoles varient selon les auteurs. De plus les siRNA ont des effets secondaires sur l'expression des gènes dits « off target ». Ces effets varient de séquence à séquence et n'ont pas été vraiment évalués dans les publications sur le sarcome d'Ewing. Le ciblage de la jonction est a priori très favorable pour la spécificité mais cela reste à prouver par la technologie des microarrays. Les conséquences cellulaires dans les cellules humaines de l'inhibition de *EWS/Flt-1* par une stratégie antisens sont variables. L'apoptose a été décrite dans deux rapports. L'inhibition de croissance par les ONAs et les siRNA ciblant *EWS/Flt-1* sont communément rapportés ce qui confirme les études initiales qui utilisent des stratégies antisens basées sur l'expression de plasmides [36, 37]. Nous devons cependant être prudents à propos des premiers rapports concernant l'inhibition de croissance cellulaire car les concentrations sont très élevées et il a été montré sur des cellules leucémiques que, dans de telles conditions, les produits de dégradation des oligonucléotides peuvent avoir des effets antiprolifératifs en agissant sur les pools intracellulaires de nucléotides [38]. Actuellement si on considère les cellules murines exprimant le gène humain *EWS/Flt-1*, les 2 paramètres cellulaires *in vitro* qui pourraient être prédictifs de l'effet antitumoral pourraient être l'inhibition de *EWS/Flt-1* et l'inhibition de croissance cellulaire [26]. Cependant rien n'indique que le modèle murin puisse être extrapolé à la situation humaine. De façon générale le degré d'inhibition des gènes par les siRNA est plus grand qu'avec les ONA (et obtenu à une concentration plus basse). Les résultats obtenus avec *EWS/Flt-1* comme cible confirment cette tendance (avec les deux types d'agents l'inhibition est transitoire). Cependant à

nouveau il faut être prudent dans l'interprétation de ce résultat car l'inhibition dépend de la séquence ciblée qui est en général différente pour les ONA et les siRNA. Elle dépend aussi de la modification chimique des oligonucléotides.

Enfin les siRNA pourraient être utilisés en association avec les chimiothérapies dans un but de potentialiser leur effet thérapeutique. Ainsi, Yamamoto *et al.* ont obtenu une augmentation de l'effet anti-tumoral de l'actinomycine D dans des cellules du sarcome d'Ewing *in vitro* en inhibant *EWS/Flt-1* par un siRNA [39]. En conclusion des oligonucléotides ciblant l'ARNm de *EWS/Flt-1* ont montré des effets intéressants en culture cellulaire et ont donc le potentiel d'être essayés au plan préclinique.

3.2.2. Résultats In vivo

Hu-Lieskovan *et al.* [40] ont utilisé contre *EWS/Flt-1* un siRNA condensé dans un polymère à base de sucres. Ces nanoparticules sont couplées à de la transferrine de façon à avoir une fixation préférentielle sur les cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur à la transferrine. Les nanoparticules ont été injectées par voie intraveineuse à des souris porteuses de xénogreffes de cellules humaines d'Ewing exprimant un gène rapporteur fluorescent. Un traitement à long terme entraîne une inhibition marquée de la croissance tumorale et des métastases. Toub *et al.* [41] ont utilisé un siRNA ciblant une jonction de type 1 et encapsulé dans des nanocapsules de polyalkylcyanoacrylate. Ces nanocapsules sont injectées dans la tumeur tous les 3 jours (dose totale de siRNA 1.1 mg/kg) chez la souris xénogreffée avec des cellules murines exprimant de façon permanente l'oncogène humain *EWS/Flt-1*. Une inhibition de 80 % de la croissance tumorale est obtenue avec le siRNA antisens encapsulé. Aucune inhibition n'est obtenue avec le siRNA contrôle encapsulé.

4. DISCUSSION

Beaucoup d'essais cliniques ont eu lieu en cancérologie avec des ONA. Quelques essais cliniques sont maintenant en cours avec des siRNA. Le sarcome d'Ewing est un cancer rare touchant principalement des enfants. Il est donc pleinement justifié d'utiliser des médicaments orphelins tels que des acides nucléiques qui amélioreraient la thérapie. Des maladies associées à une translocation comme le sarcome d'Ewing présentent l'intérêt de posséder une cible qui n'est présente que dans la tumeur et pas dans le tissu sain. Comparées aux leucémies, les tumeurs solides devraient être plus adaptées à un traitement par des acides nucléiques si on extrapole les résultats obtenus en culture cellulaire. La question de l'acheminement *in vivo* des courts acides nucléiques dans les cellules de la tumeur est un point très important pour le développement clinique de ces molécules. Cette question n'est que partiellement résolue et suscite de nombreux développements. Pratiquement tous les résultats d'inhibition par des oligonucléotides de tumeurs exprimant *EWS/Fli-1* ont été obtenus en utilisant des vecteurs synthétiques. Il est évident que ces vecteurs protègent les oligonucléotides contre la dégradation *in vivo*. Cependant ils peuvent avoir d'autres rôles tels que prévenir l'interaction des ONA avec des cibles non désirées et modifier les voies d'entrée des ONA dans les cellules. Enfin l'uti-

lisation de vecteurs ciblés, obtenue en couplant un ligand au vecteur synthétique, constitue un enjeu important.

La thérapie du sarcome d'Ewing a atteint un plateau de survie (~60 % pour les malades avec une tumeur localisée et 20-30 % pour les groupes à haut risque [42]). De plus si on prend en compte le caractère agressif des traitements multi-modalités donnés aux jeunes patients, il y a un risque non négligeable d'effets secondaires à long terme. Les auteurs pensent que les courts acides nucléiques synthétiques tels que les ONAs et les siRNAs qui modulent avec spécificité la protéine *EWS/Fli-1* pourraient être moins toxiques. Ils pourraient donc améliorer les traitements actuels au bénéfice des patients. Enfin le sarcome d'Ewing est une maladie orpheline. Cela veut dire qu'il est peu probable que les compagnies pharmaceutiques privées investissent pour trouver de nouveaux médicaments du sarcome d'Ewing. Ces courts acides nucléiques et leurs vecteurs ont été conçus en partie en secteur académique. Ceci devrait réduire grandement les coûts de recherche et développement pour amener de tels composés en clinique humaine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Association Leyla qui fournit la bourse de thèse de Anne-Laure Ramon. ●

/+ Bibliographie.

- ① Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith TL, Jurgens H, Gadner H, Kovar H (1996) Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14: 1245-1251
- ② Gurney JG, Davis S, Severson RK, Fang JY, Ross JA, Robison LL (1996) Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer* 78: 532-541
- ③ Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jurgens H (1999) [Descriptive epidemiology of Ewing's tumor-analysis of German patients from (E)CESS 1980-1997]. *Klin Padiatr* 211: 271-275
- ④ Cotterill SJ, Parker L, Malcolm AJ, Reid M, More L, Craft AW (2000) Incidence and survival for cancer in children and young adults in the North of England, 1968-1995: a report from the Northern Region Young Persons' Malignant Disease Registry. *Br J Cancer* 83: 397-403
- ⑤ Paulussen M, Frohlich B, Jurgens H (2001) Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs* 3: 899-913
- ⑥ Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O (2007) Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11: 421-429
- ⑦ Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, et al (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12: 4481-4487
- ⑧ Yee D, Favoni RE, Lebovic GS, Lombana F, Powell DR, Reynolds CP, Rosen N (1990) Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor. *J Clin Invest* 86: 1806-1814
- ⑨ Toretsky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D, Helman LJ (1997) The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 272: 30822-30827
- ⑩ Herrero-Martin D, Osuna D, Ordonez JL, Sevilano V, Martins AS, Mackintosh C, Campos M, Madoz-Gurpide J, Otero-Motta AP, Caballero G, Amaral AT, Wai DH, Braun Y, Eisenacher M, Schaefer KL, Poremba C, de Alava E (2009) Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target. *Br J Cancer* 101: 80-90
- ⑪ Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, Whangbo JS, Golub TR, Lessnick SL (2006) Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9: 405-416
- ⑫ Mendiola M, Carrillo J, Garcia E, Lalli E, Hernandez T, de Alava E, Tirode F, Delattre O, Garcia-Miguel P, Lopez-Barea F, Pestana A, Alonso J (2006) The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. *Int J Cancer* 118: 1381-1389
- ⑬ Kinsey M, Smith R, Lessnick SL (2006) NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Mol Cancer Res* 4: 851-859
- ⑭ Dohjima T, Lee NS, Li H, Ohno T, Rossi JJ (2003) Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/FLI-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line. *Mol Ther* 7: 811-816
- ⑮ Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24: 7275-7283
- ⑯ Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y (1997) EWS-FLI1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 99: 239-247
- ⑰ Toretsky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK (1997) Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 31: 9-16

- 18 Chansky HA, Barahmand-Pour F, Mei Q, Kahn-Farooqi W, Zielinska-Kwiatkowska A, Blackburn M, Chansky K, Conrad EU, 3rd, Bruckner JD, Greenlee TK, Yang L (2004) Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 22: 910-917
- 19 Nesterova M, Cho-Chung YS (2004) Killing the messenger: antisense DNA and siRNA. *Curr Drug Targets* 5: 683-689
- 20 Jepsen JS, Wengel J (2004) LNA-antisense rivals siRNA for gene silencing. *Curr Opin Drug Discov Devel* 7: 188-194
- 21 Wickstrom E, Choob M, Urtishak KA, Tian X, Sternheim N, Talbot S, Archdeacon J, Efimov VA, Farber SA (2004) Sequence specificity of alternating hydroxypropylphosphono peptide nucleic acids against zebrafish embryo mRNAs. *J Drug Target* 12: 363-372
- 22 Hannon GJ, Rossi JJ (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431: 371-378
- 23 Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-349
- 24 Young PJ, Francis JW, Lince D, Coon K, Androphy EJ, Lorson CL (2003) The Ewing's sarcoma protein interacts with the Tudor domain of the survival motor neuron protein. *Brain Res Mol Brain Res* 119: 37-49
- 25 Spahn L, Siligan C, Bachmaier R, Schmid JA, Aryee DN, Kovar H (2003) Homotypic and heterotypic interactions of EWS, FLI1 and their oncogenic fusion protein. *Oncogene* 22: 6819-6829
- 26 Villemeur M, Tamaddon A, Bertrand JR, Malvy C (2009) Comparative activity and specificity of antisense oligonucleotides and small interfering RNA in an in vitro Ewing sarcoma model. *The open nanomedicine journal* 2: 27-36
- 27 Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, Auclair C, Couvreur P (2000) EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 401-406
- 28 Maksimenko A, Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Couvreur P, Malvy C (2003) Therapeutic potentialities of EWS-FlI-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 1002: 72-77
- 29 Maksimenko A, Polard V, Villemeur M, Elhamess H, Couvreur P, Bertrand JR, Aboubakar M, Gottikh M, Malvy C (2005) In vivo potentialities of EWS-FlI-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes. *Ann N Y Acad Sci* 1058: 52-61
- 30 Maksimenko A, Malvy C, Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Maccario J, Couvreur P (2003) Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. *Pharm Res* 20: 1565-1567
- 31 Elhamess H, Bertrand JR, Maccario J, Maksimenko A, Malvy C (2009) Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles. *Oligonucleotides* 19: 255-264
- 32 Chin DJ, Green GA, Zon G, Szoka FC, Jr., Straubinger RM (1990) Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. *New Biol* 2: 1091-1100
- 33 Leonetti JP, Mechti N, Degols G, Gagnor C, Lebleu B (1991) Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2702-2706
- 34 Kovar H, Ban J, Pospisilova S (2003) Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. *Semin Cancer Biol* 13: 275-281
- 35 Siligan C, Ban J, Bachmaier R, Spahn L, Kreppel M, Schaefer KL, Poremba C, Aryee DN, Kovar H (2005) EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene* 24: 2512-2524
- 36 Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henockl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G, Gadner H (1996) EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 7: 429-437
- 37 Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES (1995) Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11: 1049-1054
- 38 Vaerman JL, Moureau P, Deldime F, Lewalle P, Lamineur C, Morschhauser F, Martiat P (1997) Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides. *Blood* 90: 331-339
- 39 Yamamoto T, Ohno T, Wakahara K, Nagano A, Kawai G, Saitou M, Takigami I, Matsuhashi A, Yamada K, Shimizu K (2009) Simultaneous inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways augment the sensitivity to actinomycin D in Ewing sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 1125-1136
- 40 Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ (2005) Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65: 8984-8992
- 41 Toub N, Bertrand JR, Tamaddon A, Elhamess H, Hillaireau H, Maksimenko A, Maccario J, Malvy C, Fattal E, Couvreur P (2006) Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-FlI1 oncogene in Ewing sarcoma. *Pharm Res* 23: 892-900
- 42 Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr (2008) Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 30: 425-430

Article 3

Vers une thérapeutique ciblée du sarcome d'Ewing par une stratégie antisens

A.-L. Ramon, C. Malvy

UMR CNRS 8121, institut Gustave Roussy, 38, rue Camille-Desmoulins, F-94800 Villejuif, France

Correspondance : Anne-laure.RAMON@igr.fr ; cmalvy@igr.fr

Reçu le 19 octobre 2009 ; accepté le 29 octobre 2009

Towards an antisense targeted therapy for Ewing sarcoma

Abstract: The Ewing sarcoma family of tumors is characterized by a translocation between chromosomes 11 and 22. This creates a rearranged chromosome 22 containing a chimeric oncogene: *EWS/Fli-1*. The *EWS/Fli-1* protein plays an important role in the transformation of Ewing cells. The fusion region at the mRNA level coding for *EWS/Fli-1* is a specific target for antisense strategies. It is indeed present only in cancer cells. We describe the in vitro and in vivo results obtained according to this idea first with antisense oligonucleotides and then with siRNAs. Finally prospects for clinical applications with antisense molecules are discussed.

Keywords: Antisense oligonucleotide – Ewing sarcoma – *EWS/Fli-1* – siRNA

Résumé : La famille de cancers reliés au sarcome d'Ewing est caractérisée par une translocation entre les chromosomes 11 et 22. Cela aboutit à un chromosome 22 remanié, dans lequel est localisé un oncogène chimérique : *EWS/Fli-1*. La protéine *EWS/Fli-1* joue un rôle important dans la transformation des cellules d'Ewing. La région de la fusion au niveau de l'ARNm codant pour *EWS/Fli-1* est une cible spécifique pour des stratégies antisens. Elle n'est en effet présente que dans les cellules de la tumeur. Nous décrivons les résultats obtenus in vitro et in vivo selon ce principe tout d'abord avec des oligonucléo-

tides antisens (ONA) et ensuite avec des siARNs. Finalement, les perspectives pour une application clinique utilisant des molécules antisens sont discutées.

Mots clés : Oligonucléotide antisens – Sarcome d'Ewing – *EWS/Fli-1* – siARN

Introduction

Environ 10 % des cancers sont caractérisés par des translocations chromosomiques. Ces translocations aboutissent à des fusions de gènes où un nouveau gène est créé, qui est constitué de deux fragments provenant chacun de l'un des deux gènes au sein desquels sont intervenues les cassures chromosomiques. Ce nouveau gène aussi appelé oncogène de fusion est souvent considéré comme responsable du cancer au sein duquel il a été identifié. Ces gènes sont notamment trouvés dans des leucémies et des sarcomes. Ces oncogènes de fusion peuvent soit coder pour un facteur de transcription, soit pour un gène contribuant à l'activation de facteurs de transcription. Ils représentent une cible intéressante au plan thérapeutique tout d'abord en tant qu'oncogènes, et aussi car leur structure particulière fait qu'ils ne se trouvent que dans les cellules cancéreuses et pas dans les cellules normales. Ils offrent donc un facteur de spécificité que l'on ne retrouve pas au plan des oncogènes dans la majorité des cancers.

Les cancers de la famille du sarcome d'Ewing (CFSE) appartiennent

à ce type de cancer caractérisé par une translocation chromosomique. Ils ont été décrits il y a environ 80 ans et comportent le sarcome osseux d'Ewing, le sarcome des tissus mous, le cancer d'Askin, les tumeurs neuroectodermiques primitives périphériques osseuses ou des tissus mous. Le sarcome d'Ewing vient au deuxième rang des cancers osseux par sa fréquence [41]. Il touche fréquemment des os plats tels que le pelvis et les côtes. Il touche aussi les os des bras et des jambes. Il s'étend de façon commune aux poumons et à la moelle osseuse. Le taux d'incidence chez les enfants (< 15 ans) est estimé à 3 pour 1 million chez les Caucasiens, avec une prépondérance masculine de 1,5/1 [7,9]. Le taux d'incidence chez les adultes est moins bien documenté. Un taux annuel d'incidence de 2,4 cas pour 1 million de patients âgés de 15 à 24 ans a été rapporté dans le Nord de l'Angleterre [3]. L'âge médian au diagnostic se situe entre 10 et 20 ans, soit la moitié des cas. Il n'y a pas de maladies associées connues, et l'origine est restée longtemps inconnue [25]. Cependant, il a récemment été montré que le sarcome d'Ewing a pour origine les cellules souches mésenchymateuses [31]. La caractéristique génétique des sarcomes d'Ewing est la présence de la translocation t(11;22)(q24;q12), présente dans 85 % des cas, ce qui entraîne la présence de l'oncogène de fusion *EWS/Fli-1* et en conséquence celle d'une protéine chimérique *EWS/Fli-1*. Des transcrits *EWS/ERG* sont également trouvés.

Plusieurs formes alternatives de *EWS/Fli-1* existent en raison de

variations dans les sites génomiques des cassures au sein de *EWS* et de *FLI-1*. La forme la plus commune (~ 60 % des cas) [41], le type 1, consiste dans les sept premiers exons de *EWS* joints aux exons 6–9 de *FLI-1*. La fusion de type 2 *EWS/FLI-1* inclut également l'exon 5 de *FLI1* et est présente dans 25 % des cas. D'autres jonctions ont été décrites. Deux publications peuvent être lues pour avoir une idée claire de la structure [41] et de la fréquence [42] des différents types de jonction.

La protéine *EWS/FLI-1* est un facteur de transcription aberrant qui selon différents auteurs régule de nombreux gènes et voies de signalisation telles que l'IGF-1 [10,33,39] ainsi que le cycle cellulaire mais aussi différentes cibles impliquées dans le développement tumoral dont les gènes *NKX2-2* [28] et *DAX-1* [13,22]. Il a été ainsi montré que quand *EWS/FLI-1* est inhibé spécifiquement par un court ARN interférant (ARNi) dans des cellules d'Ewing A673, 80 gènes sont trouvés activés et inhibés d'un facteur au moins 2.

La protéine *EWS/FLI-1* est de façon générale considérée comme la cause principale du sarcome d'Ewing. L'inhibition de cette activité protéique est donc très attrayante au plan thérapeutique. Plusieurs rapports indiquent que l'inhibition de la synthèse de la protéine *EWS/FLI-1* conduit à l'inhibition de la croissance cellulaire [4,26,30,32] et au rétablissement de l'apoptose [1,4,26,30,32].

Objet de l'Étude

La séquence nucléique de la jonction n'est présente que dans l'ARN messager (ARNm) des cellules tumorales. Cette jonction est donc une cible extrêmement attrayante pour une thérapie sélective du sarcome d'Ewing. À notre connaissance, il n'y a pas eu de tentative pour cibler la fusion au niveau de l'ADN ou du transcrit primaire. Ce serait d'ailleurs difficile, car les points de jonction sont introniques et variables d'un patient à l'autre.

Des séquences de jonction de catégories définies n'apparaissent en effet qu'après l'épissage au niveau de l'ARNm. Par contre, l'objet de cette étude est l'utilisation de stratégies antisens pour inhiber *EWS/FLI-1* au niveau de l'ARN. Nous analyserons les résultats obtenus avec des oligonucléotides (ON) soit des oligonucléotides antisens (ONA), soit des petits ARN interférants (siARN). Ces ON sont conçus pour inhiber soit *EWS/FLI-1*, soit d'autres gènes impliqués dans la maintenance du phénotype transformé des cellules d'Ewing. De nombreux essais cliniques ont été et sont menés avec des ONA et plus récemment avec des siARN. Le sarcome d'Ewing est un cancer certes rare mais agressif et touchant majoritairement des enfants. Si on prend en compte que la protéine responsable présumée de ce cancer peut être inhibée par des stratégies antisens, on peut considérer que les malades devraient bénéficier d'une approche antisens au plan thérapeutique.

Les ONA appartiennent à deux catégories selon leurs modifications chimiques. Le premier type [23], tel que les ONA phosphorothioates, fonctionne en induisant la coupure de l'ARNm de façon séquence spécifique soit au niveau du transcrit ARN primaire (avant épissage), soit au niveau de l'ARNm mature. Pour la plupart des ONA décrits dans la littérature et ayant des cibles exoniques, on ne sait pas vraiment auquel des deux niveaux ils agissent. La coupure de la cible est obtenue par l'action de la RNase H, enzyme exprimée de façon ubiquitaire dans toutes les cellules répliquant de l'ADN. Après la coupure, l'ONA est disponible pour entraîner la coupure d'autres molécules d'ARNm. Le second type, tel que les ONA morpholinos [12,37], fonctionne en inhibant la traduction. Cependant, le temps de vie dans les cellules des ONA est limité, principalement à cause de l'action d'exonucléases dégradant l'ADN par l'extrémité 3'. Les dernières générations d'ONA comportent une partie sensible à la RNase H, par exemple en phosphorothioate,

encadrée par des parties résistantes à la dégradation telles que 2'éthoxyméthoxy ou acides nucléiques de type *locked*.

Les siARN sont des ON de type ARN en double brin. La partie duplex a une longueur de 19 bases, et chaque ON du duplex se termine en 3' par deux bases flanquantes non appariées. Ils induisent une coupure séquence spécifique de l'ARNm dans le cytoplasme, en dirigeant le complexe de coupure induit par l'ARN (RISC) vers la séquence complémentaire du brin antisens du siARN au niveau de l'ARNm. Les siARN comme les ONA peuvent être chimiquement modifiés pour augmenter leur résistance à la dégradation et augmenter leur spécificité. Des siARN peuvent aussi être synthétisés directement dans la cellule après maturation d'un court ARN en épingle à cheveu (shARN) qui est exprimé à partir d'un plasmide sous le contrôle du promoteur d'une ARN polymérase II ou III. Les shARN artificiels ont une structure qui ressemble à celle des microARN qui eux sont naturels (miARN) et qui inhibent la traduction et jouent un rôle important dans le développement embryonnaire. La maturation des shARN peut produire des siARNs (qui dégradent la cible ARNm) ou des miARN. Il y a beaucoup de revues sur l'interférence ARN (voir [8,21] pour des revues sur siARN, shARN et miARN).

Méthodes et descriptif des travaux

Résultats obtenus avec des ON antisens

Les deux rapports initiaux par Tanaka et al. [30] et Toretzky et al. [32] utilisant des ONA datent de 1997. Ils traitent de plusieurs lignées d'Ewing en culture, de cellules SKNMC in vivo [30] et de cellules TC32 [32]. Les deux publications traitent d'ONA ciblant une jonction *EWS/FLI-1* de type 1. Tanaka et al. utilisent des phosphorothioates. Ils les ajoutent aux cellules sans agent de transfection. Les concentrations utilisées étaient donc dans la

gamme des micromolaires. Un ONA ciblant la séquence de jonction était efficace pour inhiber la croissance de cellules SKNMC in vitro. Cependant, les ONA utilisés pour les autres lignées cellulaires ainsi qu'in vivo pour les tumeurs obtenues par greffe de cellules SKNMC étaient ciblés contre la partie EWS de EWS/Fli-1. En conséquence, ils induisaient à la fois l'inhibition de la synthèse des protéines EWS/Fli-1 et EWS. Ils ont obtenu une inhibition de la croissance de la tumeur à une dose totale de 187 mg/kg. Dans l'article de Toretsky et al., les ON sont de type phosphodiester, protégés en 3' et 5' par un groupement thioate. L'électroporation est utilisée pour les faire pénétrer dans les cellules. Plusieurs ONA ciblant la jonction sont étudiés, et l'un d'entre eux, ciblant la jonction de type 1, réduit la concentration de la protéine EWS/Fli-1 dans les cellules. Cependant, et de façon inattendue, la protéine EWS exprimée par le chromosome 22 non transloqué est aussi inhibée. Une inhibition de croissance cellulaire est observée, que les auteurs attribuent à l'inhibition de EWS/Fli-1, car l'inhibition de EWS par le même ONA dans des cellules PC-3M qui ne présentent pas de fusion n'induit pas d'inhibition de croissance cellulaire. Il a été confirmé par ailleurs que l'inhibition de EWS par des ONA n'est pas létale pour des cellules Hela [40]. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution, car la fonction cellulaire de EWS, exprimé de façon ubiquitaire au niveau des cellules souches, n'est pas connue. Il a été rapporté que les protéines EWS/Fli-1 et EWS peuvent former des hétérodimères [29]. L'inhibition concomitante de EWS/Fli-1 et de EWS peut donc avoir un effet coopératif concernant l'action de EWS/Fli-1. Cependant, si on considère le modèle des cellules NIH/3T3 exprimant EWS/Fli-1, l'inhibition de EWS n'est pas souhaitable [36]. L'ON phosphorothioate de 25 bases décrit par Tanaka et al. [30] a aussi été utilisé in vivo par Lambert et al. [16], en utilisant des xénogreffes de souris obtenues à partir de cellules NIH/3T3 transformées par EWS/Fli-1. Cet ONA cible

la fusion de type 1 tout en s'hybridant de façon plus forte à la partie Fli-1 de EWS/Fli-1. Lambert et al. l'ont encapsulé dans des nanoparticules polymériques qu'ils ont injecté directement dans les tumeurs exprimant EWS/Fli-1. Ils ont observé une inhibition de 70 % de la croissance tumorale à la dose de 5 mg/kg avec l'ONA et pas d'inhibition avec l'ON témoin. Aucune inhibition n'a été non plus observée en utilisant l'ONA non encapsulé. Avec le même modèle tumoral, Maksimenko et al. ont utilisé un ONA de 30 bases également dirigé contre la jonction de type 1. Cet ONA a une affinité plus forte pour EWS que pour Fli-1. Le calcul montre qu'il doit avoir une structure en tige boucle, la tige étant constituée de 22 nucléotides en phosphodiester (comprenant cinq nucléotides non complémentaires de la cible mais servant à la stabilisation de la cible et à sa protection contre la dégradation) et d'une boucle de huit phosphorothioates pour le protéger de l'attaque par les nucléases simple brin [18]. Il a été montré que cet ONA agit bien comme un antisens, inhibant EWS/Fli-1 de 50 % après ajout, en présence de lipides cationiques à des cellules NIH 3T3 exprimant de façon stable EWS/Fli-1 [20]. L'inhibition de l'ARMm de EWS est alors de l'ordre de 10 % (A. Maksimenko, communication personnelle). Après fixation à des nanosphères polymériques recouvertes d'un composé cationique, le cetyltriméthylammonium bromide (CTAB), cet ON inhibe aussi la croissance tumorale après administration intratumorale. À la même dose d'ON (5 mg/kg), l'inhibition obtenue est légèrement meilleure que celle obtenue en utilisant le 25mer phosphorothioate encapsulé [19]. Ce résultat est intéressant, car il signifie que quoique l'utilisation in vivo du vecteur polymérique soit requise, l'effet obtenu est similaire bien que l'ON et le système de vectorisation soient différents. Il semble donc qu'il y ait une sensibilité intrinsèque à l'action in vivo des ON ciblés contre EWS/Fli-1 dans ce modèle murin. L'ONA tige-boucle fixé aux nanosphères polymériques n'inhibe

pas spécifiquement la croissance cellulaire en culture [20] ; cependant, il inhibe l'expression de EWS/Fli-1 en culture cellulaire avec spécificité (A. Maksimenko, communication personnelle). Il semble donc que l'inhibition de EWS/Fli-1 soit un élément déterminant pour obtenir un effet antitumoral par administration intratumorale. Par la suite, ces ONA fixés sur des nanoparticules ont été montrés comme actifs par voie intraveineuse [20]. Elhames et al. ont notamment montré que la délivrance d'un ON antisens par des nanoparticules polyisohexy-cyanoacrylate-chitosane (PIHCA-chitosane) par voie systémique permettait d'inhiber la croissance tumorale chez la souris de manière spécifique (25 % d'inhibition à 120 mg/kg) [5]. Il est connu que les ONA, une fois dans le cytoplasme, sont rapidement transloqués dans le noyau [2,17] où la RNase H est présente. Ainsi, on pourrait les destiner à agir sur le transcrit primaire non épissé. Théoriquement, le ciblage de la région intronique de jonction du transcrit primaire nucléaire peut permettre d'empêcher la résistance à l'ON dans la tumeur en sélectionnant des cellules qui ont un épissage alternatif [15]. Cependant, cette jonction varie de malade à malade. Il faudrait donc alors personnaliser l'ON pour chaque patient. Cela paraît difficile, et à notre connaissance cela n'a jamais été essayé.

Résultats obtenus avec des siARNs

Culture cellulaire

Jusqu'à maintenant, on pense que l'activité inhibitrice des siARNs est localisée dans le cytoplasme où est localisé le complexe RISC. La jonction EWS/Fli-1 au niveau de l'ARNm est évidemment aussi une cible intéressante pour les siARNs. Dohijma et al. [4] ont étudié l'action de deux siARNs exprimés de façon intracellulaire à partir de shARN et dirigés contre une jonction de type 1 dans des cellules TC135. L'un des deux siARNs a aussi partiellement inhibé Fli-1. Les deux siARNs ont entraîné la

dégradation de 80 % de leur cible ARNm (ce qui confirme leur activité siARN) et réduit la croissance cellulaire de 50–60 %. Siligan et al. [27] ont utilisé des siARNs exprimés à partir de shARN dans trois lignées différentes de sarcome d'Ewing : STA-ET-7.2, SK-N-MC et TC52 ; une, ciblant la région de la jonction de type 1 (identique à la séquence de Dohjima et al.), une autre, celle de type 2 et, une troisième, la partie *Fli-1* de la jonction. Quand ils sont exprimés intracellulairement à partir de shARN inclus dans un vecteur rétroviral sous promoteur transcrit par l'ARN polymérase III, tous les trois inhibent spécifiquement l'expression de *EWS/Fli-1* en induisant la dégradation de l'ARNm. Ils inhibent également la croissance de cellules d'Ewing en culture monocouche et en agar mou. Chansky et al. [1] ont également utilisé un

siARN dirigé contre la jonction de type 2 dans des cellules SK-ES. Cependant, ce siARN n'est pas efficace. Ils ont observé l'inhibition de *EWS/Fli-1* par un siARN électroporé dirigé contre la partie *Fli-1*. *Fli-1* n'est pas exprimé dans les cellules SK-ES-1 au niveau protéique. Les conséquences pour les cellules SK-ES-1 sont une augmentation de l'apoptose et une inhibition de l'invasivité dans un essai in vitro. Prieur et al. [26] ont utilisé un siARN ciblant la jonction de type 1. Ce siARN a une cible localisée entre les cibles choisies par Dohjima et al. [4] (Fig. 1). Ce siARN synthétique a été transfecté avec l'oligofectamine dans des cellules A673. Il a été alors utilisé, grâce à la technique des microarray, pour identifier les gènes régulés par *EWS/Fli-1*. Ce siARN induit dans les cellules A673 après deux transfections un

arrêt complet de la croissance et une augmentation très importante du nombre de cellules apoptotiques.

Il est difficile de tirer des conclusions générales de ces expériences avec les siARN, car les séquences ainsi que les protocoles varient selon les auteurs. De plus, les siARN ont des effets secondaires sur l'expression des gènes dits *off target*. Ces effets varient de séquence à séquence et n'ont pas été vraiment évalués dans les publications sur le sarcome d'Ewing. Le ciblage de la jonction est a priori très favorable pour la spécificité, mais cela reste à prouver par la technologie des microarrays. Les conséquences cellulaires dans les cellules humaines de l'inhibition de *EWS/Fli-1* par une stratégie antisens sont variables. L'apoptose a été décrite dans

	EWS	FLI-1
	POINT DE JONCTION	
	↓	
	5'UCAAUUAUGCCAACAGAGCAGCAGCUACGGGCAGCAGAACCCUUCUUAUGACUCAGUCAGAAGAGCAG 3' (1)	
	GCAGCUACGGGCAGCAGAACCCUUC (2)	
	GCAGAACCCUUCUUAUGACUCAGUC (3)	
ANTISENS	AGCAGAACCCUUCUUAUGAC (4)	
	CAGCUACGGGCAGCAGAACCCUUC (5)	
	AGCAGAACCCUUCU (6)	
	UACGGGCAGCAGAACCCUUCUUAUG (7)	
	GGCAGCAGAACCCUUCUUA (8)	
siRNA	AGCUACGGGCAGCAGAACCC (9)	
	AGCAGAACCCUUCUUAUGAC (10)	
	CAGCUACGGGCAGCAGAACCC (11)	
	GCAGAACCCUUCUUAUGAC (12)	

Fig. 1.

Séquences ARNm cibles utilisées dans la littérature

(1) : Point de jonction de l'ARNm de *EWS/Fli-1*.

(2) : Maksimenko et al. [18]

(3) : Tanaka et al. [30] ; Lambert et al. [16]

(4) : Toretsky et al. [32]

(5) : Toretsky et al. [32]

(6) : Toretsky et al. [32]

(7) : Tanaka et al. [30]

(8) : Prieur et al. [26]

(9) : Dohjima et al. [4]

(10) : Dohjima et al. [4]

(11) : Toub et al. [34]

(12) : Siligan et al. [27]

deux rapports. L'inhibition de croissance par les ONAs et les siARN ciblant *EWS/Fli-1* sont communément rapportés, ce qui confirme les études initiales qui utilisent des stratégies antisens basées sur l'expression de plasmides [14,24]. Nous devons cependant être prudents à propos des premiers rapports concernant l'inhibition de croissance cellulaire, car les concentrations sont très élevées, et il a été montré sur des cellules leucémiques que, dans de telles conditions, les produits de dégradation des ON peuvent avoir des effets antiprolifératifs en agissant sur les pools intracellulaires de nucléotides [35]. Actuellement, si on considère les cellules murines exprimant le gène humain *EWS/Fli-1*, les deux paramètres cellulaires *in vitro* qui pourraient être prédictifs de l'effet antitumoral pourraient être l'inhibition de *EWS/Fli-1* et l'inhibition de croissance cellulaire [36]. Cependant, rien n'indique que le modèle murin puisse être extrapolé à la situation humaine. De façon générale, le degré d'inhibition des gènes par les siARN est plus grand qu'avec les ONA (et obtenu à une concentration plus basse). Les résultats obtenus avec *EWS/Fli-1* comme cible confirment cette tendance (avec les deux types d'agents, l'inhibition est transitoire). Cependant, à nouveau, il faut être prudent dans l'interprétation de ce résultat, car l'inhibition dépend de la séquence ciblée qui est en général différente pour les ONA et les siARN. Elle dépend aussi de la modification chimique des ON.

Enfin, les siARN pourraient être utilisés en association avec les chimiothérapies dans un but de potentialiser leur effet thérapeutique. Ainsi, Yamamoto et al. ont obtenu une augmentation de l'effet antitumoral de l'actinomycine D dans des cellules du sarcome d'Ewing *in vitro* en inhibant *EWS/Fli-1* par un siARN [38].

En conclusion, des ON ciblant l'ARNm de *EWS/Fli-1* ont montré des effets intéressants en culture cellulaire et ont donc le potentiel d'être essayés au plan clinique.

Résultats *in vivo*

Hu-Lieskovan et al. [11] ont utilisé contre *EWS/Fli-1* un siARN condensé dans un polymère à base de sucres. Ces nanoparticules sont couplées à de la transferrine de façon à avoir une fixation préférentielle sur les cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur à la transferrine. Les nanoparticules ont été injectées par voie intraveineuse à des souris porteuses de xénogreffes de cellules humaines d'Ewing exprimant un gène rapporteur fluorescent. Un traitement à long terme entraîne une inhibition marquée de la croissance tumorale et des métastases. Toub et al. [34] ont utilisé un siARN ciblant une jonction de type 1 et encapsulé dans des nanocapsules de polyalkylcyanoacrylate. Ces nanocapsules sont injectées dans la tumeur tous les trois jours (dose totale de siARN : 1,1 mg/kg) chez la souris xénogreffée avec des cellules murines exprimant de façon permanente l'oncogène humain *EWS/Fli-1*. Une inhibition de 80 % de la croissance tumorale est obtenue avec le siARN antisens encapsulé. Aucune inhibition n'est obtenue avec le siARN témoin encapsulé.

Discussion

Beaucoup d'essais cliniques ont eu lieu en cancérologie avec des ONA. Quelques essais cliniques sont maintenant en cours avec des siARN. Le sarcome d'Ewing est un cancer rare, touchant principalement des enfants. Il est donc pleinement justifié d'utiliser des médicaments orphelins tels que des acides nucléiques qui amélioreraient la thérapie. Des maladies associées à une translocation comme le sarcome d'Ewing présentent l'intérêt de posséder une cible qui n'est présente que dans la tumeur et pas dans le tissu sain. Comparées aux leucémies, les tumeurs solides devraient être plus adaptées à un traitement par des acides nucléiques si on extrapole les résultats obtenus en culture cellulaire. La question de l'acheminement *in vivo* des courts acides

nucléiques dans les cellules de la tumeur est un point très important pour le développement clinique de ces molécules. Cette question n'est que partiellement résolue et suscite de nombreux développements. Pratiquement, tous les résultats d'inhibition par des ON de tumeurs exprimant *EWS/Fli-1* ont été obtenus en utilisant des vecteurs synthétiques. Il est évident que ces vecteurs protègent les ON contre la dégradation *in vivo*. Cependant, ils peuvent avoir d'autres rôles tels que prévenir l'interaction des ONA avec des cibles non désirées et modifier les voies d'entrée des ONA dans les cellules. Enfin, l'utilisation de vecteurs ciblés, obtenue en couplant un ligand au vecteur synthétique, constitue un enjeu important.

La thérapeutique du sarcome d'Ewing a atteint un plateau de survie (~ 60 % pour les malades avec une tumeur localisée et 20–30 % pour les groupes à haut risque [6]). De plus, si on prend en compte le caractère agressif des traitements multimodalités donnés aux jeunes patients, il y a un risque non négligeable d'effets secondaires à long terme. Les auteurs pensent que les courts acides nucléiques synthétiques, tels que les ONAs et les siARNs qui modulent avec spécificité la protéine *EWS/Fli-1*, pourraient être moins toxiques. Ils pourraient donc améliorer les traitements actuels au bénéfice des patients. Enfin, le sarcome d'Ewing est une maladie orpheline. Cela veut dire qu'il est peu probable que les compagnies pharmaceutiques privées investissent pour trouver de nouveaux médicaments du sarcome d'Ewing. Ces courts acides nucléiques et leurs vecteurs ont été conçus en partie en secteur académique. Cela devrait réduire grandement les coûts de recherche et de développement pour amener de tels composés en clinique.

Remerciements

Les auteurs remercient l'Association Leyla qui fournit la bourse de thèse d'Anne-Laure Ramon.

Déclaration de conflit d'intérêt :
Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Chansky HA, Barahmand-Pour F, Mei Q, et al. (2004) Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 22: 910-7
- Chin DJ, Green GA, Zon G, et al. (1990) Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. *New Biol* 2: 1091-100
- Cotterill SJ, Parker L, Malcolm AJ, et al. (2000) Incidence and survival for cancer in children and young adults in the North of England, 1968-1995: a report from the Northern Region Young Persons' Malignant Disease Registry. *Br J Cancer* 83: 397-403
- Dohjima T, Lee NS, Li H, et al. (2003) Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/FLI-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line. *Mol Ther* 7: 811-16
- Elhamess H, Bertrand JR, Maccario J, et al. (2009) Antitumor vectorized oligonucleotides in a model of Ewing sarcoma: unexpected role of nanoparticles. *Oligonucleotides* 19: 255-64
- Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr (2008) Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: surveillance epidemiology and end results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 30: 425-30
- Gurney JG, Davis S, Severson RK, et al. (1996) Trends in cancer incidence among children in the US. *Cancer* 78: 532-41
- Hannon GJ, Rossi JJ (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431: 371-8
- Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, et al. (1999) Descriptive epidemiology of Ewing's tumor: analysis of German patients from (E)CESS 1980-1997. *Klin Padiatr* 211: 271-5
- Herrero-Martin D, Osuna D, Ordonez JL, et al. (2009) Stable interference of EWS-FLI-1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target. *Br J Cancer* 101: 80-90
- Hu-Lieskovan S, Heideil JD, Bartlett DW, et al. (2005) Sequence-specific knock-down of EWS-FLI-1 by targeted, non-viral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65: 8984-92
- Jepsen JS, Wengel J (2004) LNA-antisense rivals siRNA for gene silencing. *Curr Opin Drug Discov Devel* 7: 188-94
- Kinsey M, Smith R, Lessnick SL (2006) NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Mol Cancer Res* 4: 851-9
- Kovar H, Aryee DN, Jug G, et al. (1996) EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 7: 429-37
- Kovar H, Ban J, Pospisilova S (2003) Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. *Semin Cancer Biol* 13: 275-81
- Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, et al. (2000) EWS FLI-1 antisense nanocapsules inhibits Ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 401-6
- Leonetti JP, Mecht N, Degols G, et al. (1991) Intracellular distribution of micro-injected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2702-6
- Maksimenko A, Lambert G, Bertrand JR, et al. (2003) Therapeutic potentialities of EWS-FLI-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 1002: 72-7
- Maksimenko A, Malvy C, Lambert G, et al. (2003) Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. *Pharm Res* 20: 1565-7
- Maksimenko A, Polard V, Villemeur M, et al. (2005) In vivo potentialities of EWS-FLI-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes. *Ann N Y Acad Sci* 1058: 52-61
- Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-9
- Mendiola M, Carrillo J, Garcia E, et al. (2006) The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI-1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. *Int J Cancer* 118: 1381-9
- Nesterova M, Cho-Chung YS (2004) Killing the messenger: antisense DNA and siRNA. *Curr Drug Targets* 5: 683-9
- Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, et al. (1995) Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11: 1049-54
- Paulussen M, Frohlich B, Jurgens H (2001) Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs* 3: 899-913
- Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24: 7275-83
- Siligan C, Ban J, Bachmaier R, et al. (2005) EWS-FLI-1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene* 24: 2512-24
- Smith R, Owen LA, Trem DJ, et al. (2006) Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9: 405-16
- Spahn L, Siligan C, Bachmaier R, et al. (2003) Homotypic and heterotypic interactions of EWS-FLI-1 and their oncogenic fusion protein. *Oncogene* 22: 6819-29
- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, et al. (1997) EWS-FLI-1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 99: 239-47
- Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, et al. (2007) Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11: 421-9
- Toretzky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK (1997) Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 31: 9-16
- Toretzky JA, Kalebic T, Blakesley V, et al. (1997) The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 272: 30822-7
- Toub N, Bertrand JR, Tamaddon A, et al. (2006) Efficacy of siRNA nanocapsules targeted against the EWS-FLI-1 oncogene in Ewing sarcoma. *Pharm Res* 23: 892-900
- Vaerman JL, Moureau P, Deldime F, et al. (1997) Antisense oligodeoxynucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides. *Blood* 90: 331-9
- Villemeur M, Tamaddon A, Bertrand JR, Malvy C (2009) Comparative activity and specificity of antisense oligonucleotides and small interfering RNA in an in vitro Ewing sarcoma model. *Open Nanomedicine J* 2: 27-36
- Wickstrom E, Choob M, Urtishak KA, T et al. (2004) Sequence specificity of alternating hydroxypropyl/phosphono peptide nucleic acids against zebrafish embryo mRNAs. *J Drug Target* 12: 363-72
- Yamamoto T, Ohno T, Wakahara K, et al. (2009) Simultaneous inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways augments the sensitivity to actinomycin D in Ewing sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 1125-36
- Yee D, Favoni RE, Lebovic GS, et al. (1990) Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor. *J Clin Invest* 86: 1806-14
- Young PJ, Francis JW, Lince D, et al. (2003) The Ewing's sarcoma protein interacts with the Tudor domain of the survival motor neuron protein. *Brain Res Mol Brain Res* 119: 37-49
- Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, et al. (1996) Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14: 1245-51
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, et al. (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12: 4481-7

Curriculum Vitae

RAMON Anne-Laure

10 rue Taine
75 012 Paris, France

Born 08/29/1983
Single, French

+33(0)6.23.99.15.54
anne-laure.ramon@hotmail.fr

Employment experiences

2008-2012 PhD in pharmaceutical technology: formulation of immunonanoparticles for the treatment of Ewing's Sarcoma

Supervisors: **Dr. Vauthier** (christine.vauthier@u-psud.fr) / **Prof. Malvy** (claudemalvy@yahoo.fr)
CNRS 8612 Pharmacotechny, physics, chemistry and biopharmacy. **Dir: Pr. Fattal**
Gustave Roussy Institute of Oncology/ CNRS 8203. **Dir: Dr. Mir**

Main results: Development and characterization of targeted polymeric nanoparticles for the delivery of siRNA. Immunonanoparticles efficiently reach the tumor *in vivo* (i.v.) and improve biological response compared to the untargeted system.

Areas of interest: Formulation, drug delivery, cell and molecular biology, RNA interference, animal experimentation

Technical skills : polymerization (cyanoacrylates, chitosan), DLS, microscopy, UV spectrometry, radioactive labeling, cell and molecular biology, flow cytometry, *in vivo* experimentation, *in vivo* fluorescent imaging (nanoparticles and tumors), complement activation.

Transversal skills: fundraising and writing of scientific projects, written and oral reports, supervision of students (M.Sc and engineer levels).

2010 Lecturer, University Paris 12 Creteil, France, Cell biology, bachelor's degree.

2008 Gustave Roussy Institute, Villejuif, France (6 months)

Optimization of a formulation of polymeric nanocapsules with an aqueous core for the encapsulation of siRNA, characterization and evaluation for the treatment of radio induced thyroid cancer

Results: 30% *in vitro* improvement of inhibition of the targeted gene after optimizing the formulation.

2007 Oralance Pharma, Paris/Toulouse, France (4 months) «Formulation and characterization of lipid microparticles for coating and taste masking. Evaluation of dissolution tests. »

Results: Determination of the key formulation parameters for relevant dissolution testing of various lipid microparticles encapsulating hydrophobic APIs.

Technical skills: microparticle formulation and production, dissolution testing, HPLC, DSC

Education

2008-2012 PhD from University Paris-Sud XI with specialization in drug delivery

2011 ULLA Summer School, Parma, Italy

2008 MSc. «Pharmaceutical technology and biopharmacy», Faculty of pharmacy, Paris-Sud XI

2002-2008 Pharmacist specialized in pharmaceutical/biotechnological industry, Faculty of pharmacy Paris XI.

Publications

- 2012 Ramon AL et al.** Efficiency of targeted polymeric nanoparticles carrying siRNA as a new treatment for Ewing's Sarcoma. **Submitted.**
- 2009 Ramon AL, et al.** (2009). Anticancer Oligonucleotides. In Reddy, L. Harivardhan and Couvreur, Patrick (Eds.), *Macromolecular anticancer therapeutics*, pp. 539-571. New-York : Springer.
- A.L. Ramon, et al.** Vers une thérapie ciblée du sarcome d'Ewing par une stratégie antisens. *Bio tribune magazine*. 2009, 33(1): 25-30
- A.L. Ramon, et al.** Vers une thérapie ciblée du sarcome d'Ewing par une stratégie antisens. *Oncologie*. 2009, 11:159-164
- 2008 AL Ramon, et al.** "Delivery of small interfering RNA: A review and an example of application to a junction oncogene", *Tumori*, 96: 253-262

Oral Communication

- 2011 Anne-Laure Ramon, et al..** Development of targeted core shell nanoparticles and applications for the treatment of Ewing's Sarcoma. PharmSciFair, 2011, June 13-17, Prague, Czech Republic.

Written Communications

- 2011 Anne-Laure Ramon, et al.** Development of targeted core shell nanoparticles and applications for the treatment of Ewing's Sarcoma, ULLA Summer School, July 2-8, Parma, Italy.
- Christelle Zandanel, Magali Noiray, **Anne-Laure Ramon**, Christine Vauthier. Nanoparticules pour l'administration de siRNA. Chimie et santé : de la molécule au médicament. May, 05. Paris, France
- Anne-Laure Ramon, et al.** Development of targeted core shell nanoparticles and applications for the treatment of Ewing's Sarcoma. JED, ED 425, May 13-14, Châtenay-Malabry , France.
- 2010 Anne-Laure Ramon, et al.** Development of targeted core shell nanoparticles and applications for the treatment of Ewing's Sarcoma. 25th meetings of GTRV, Toulouse, France.
- Anne-Laure Ramon, et al.:** New targeted pharmaceutical approach for the treatment of Ewing's sarcoma. Collège de France, 2^d annual meeting of ITS, Paris, France.
- Anne-Laure Ramon, et al.:** New targeted pharmaceutical approach for the treatment of Ewing's sarcoma. Science Meeting of the Faculty of Medicine of Kremlin-Bicetre, France.

Other skills and qualifications

- Computing: Office, Adobe creative suite, Endnote, Cytometry softwares, Graphpad, Image J.
- Languages: **English** (fluent, TOEIC 880/990, 2007) / **Spanish** (conversational)
- Elected representative of students in laboratory council
- French habilitation for animal experimentation

Hobbies

- Sports: Traditional ju-jitsu, horse riding, running
- Culture: travels, reading, cinema, music (piano/violin), cooking.
- Non benefit work: Seminars of science vulgarization for high school students (2010 and 2011, Science Academy).

Résumé :

Ce travail a permis de réaliser une évaluation complète de différentes séquences de siRNA dirigées contre EWS/Fli-1 dans le cadre du traitement des tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing. Un siRNA a été vectorisé de manière efficace par des nanoparticules polymères ciblées contre un marqueur membranaire spécifique des ESFT. Ces nanoparticules ont été caractérisées et semblent bien tolérées à la fois *in vitro* et *in vivo*. Leur évaluation a été réalisée sur des cellules humaines et après prise des tumeurs ce qui représente une avancée intéressante dans la lutte contre les ESFT. La mise au point d'un modèle fluorescent de sarcome d'Ewing permettra de mieux caractériser leur effet sur les métastases, facteur essentiel dans la survie des patients. Enfin, il a été montré que les techniques d'imagerie *in vivo* permettaient de suivre le devenir *in vivo* des nanoparticules ce qui permettra de comprendre leur biodistribution et leur mode d'action.

Mots clés :

poly(isobutylcyanoacrylate)

siRNA

nanoparticules

in vivo

Imagerie

Ewing

Laboratoires de rattachement :

UMR CNRS 8612 Physico-Chimie - Pharmacotechnie – Biopharmacie

UMR CNRS 8203 Vectorologie et thérapies anti-cancéreuses, Institut Gustave Roussy

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex