**Synthèse du travail :**

**Introduction**

Le cancer de la thyroïde est la tumeur endocrine la plus fréquente et représente 95% des cancers endocriniens (Keefe *et al.* 2010). Son taux d'incidence a augmenté au cours des dernières années (2005 à 2009) de 5,6% par an chez les hommes et de 7,0% par an chez les femmes dans la plupart des pays développés (Chen *et al.* 2009; Enewold *et al.* 2009; Kilfoy *et al.* 2009; Pellegriti *et al.* 2013, American Cancer Society, 2013). Aux États-Unis, 56 460 et 60 220 nouveaux cas de cancer de la thyroïde ont été rapportés en 2012 et 2013 (Siegel *et al.* 2012). L'incidence annuelle de cancer de la thyroïde varie considérablement entre les différents régions ; de 1,2 à 2,6 cas chez les hommes et de 2,0 à 3,8 cas chez les femmes par 100 000 personnes (Nagataki and Nystrom 2002; Venencia *et al.* 2002; Zaman *et al.* 2006). Le sexe ratio est plus élevé chez les femmes (trois patients sont des femmes sur quatre) ainsi que le taux de mortalité (1,3 fois plus élevé chez les femmes, *i.e.* 1 040 femmes *vs* 810 hommes).

Deux types de cellules endocriniennes sont responsables du développement du carcinome thyroïdien (TC) : les cellules épithéliales et des cellules parafolliculaires. Les formes TC dérivées des cellules épithéliales comprennent TC différenciés (DTC) [y compris papillaire (PTC; environ 70-80%) et folliculaires (FTC; 10-20%) TC] et le carcinome thyroïdien indifférencié ou anaplasique (ATC; 2-5%). La tumeur de la thyroïde dérivé de cellules parafolliculaires est nommé le carcinome médullaire de la thyroïde (MTC) et représente environ 3 à 10% de cancer de la thyroïde (Benvenga 2008; Zhu and Cheng 2009; Chougnet *et al.* 2010; Keefe *et al.* 2010).

L'augmentation de l'incidence du cancer de la thyroïde est principalement du à celui du type papillaire (Leenhardt *et al.* 2004b, Pellegriti *et al.* 2013). L'exposition aux radiations ionisantes est un facteur de risque établi pour cancer de la thyroïde. Le PTC est fréquemment retrouvé chez les personnes ayant été exposées à de fortes radiations externes accidentelles, comme par exemple, à la suite de l'explosion du réacteur de la centrale nucléaire de Tchernobyl en 1986, ainsi que chez les personnes ayant déjà été traitées par radiothérapie. D'après plusieurs auteurs, la tomodensitométrie (TDM) utilisée en particulier en pédiatrie conduirait à une augmentation du risque de développer un PTC (Baker and Bhatti 2006, How and Tabah 2007).

Au niveau moléculaire, le carcinome papillaire de la thyroïde est principalement caractérisé par des réarrangements génomiques, entre le gène RET (REarranged during Transfection) et 12 autres gènes exprimés dans la thyroïde conduisant à 13 onco-fusions différentes type RET/PTC (Romei and Elisei 2012). Les variants les plus fréquemment observés chez les patients sont RET/PTC1 et RET/PTC3. Ces variants sont dus à une inversion para-centrique du chromosome 10 (10q11.2) entre la partie intracellulaire du gène RET et respectivement les gènes H4/CCDC6 ou ELE1/NCOA4. Chez l'homme, La proximité spatiale de RET entre le gène RET et les gènes partenaires, NCOA4 et H4 (situés dans la même région chromosomique 10q11.2) (Gandhi and Nikiforov 2011) serait à la base de la formation de réarrangements RET/PTC (Nikiforova *et al.* 2000, Gandhi *et al.* 2006). Ces altérations génétiques, présents dans environ 80% des cas de cancer de la thyroïde (Moses *et al.* 2010) sont à l'origine de l'activation de plusieurs voies de signalisation menant à une augmentation de la prolifération cellulaire dont celle des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Castellone *et al.* 2009).

Malgré des progrès dans le traitement du cancer suite à la découverte d'applications thérapeutiques innovantes, un nombre considérable de patients retrouvent une maladie récurrente avec un phénotype résistant. Parmi les stratégies de traitement, l'interférence à l'ARN (ARNi) a progressé d'un outil de laboratoire puissant vers des modalités thérapeutiques potentielles dans le domaine de la thérapie ciblée.

L'interférence ARN (ARNi) est un mécanisme post-transcriptionnel de l'inactivation de gènes par la dégradation de l'ARNm ou de l'inhibition directe de la traduction des protéines (Caplen 2004; Dorsett and Tuschl 2004; Shankar *et al.* 2005; Ramachandran and Ignacimuthu 2013). Elle peut être induite par l'introduction d'ARN ou d'ADN simple brin de 13 à 25 bases; les oligonucleotides anti sens (AS-ONs), par de l'ADN plasmatique (ADNp) qui exprime courts ARN (shRNA) qui par la suite sont traitées comme siRNA par la machinerie cellulaire (McManus and Sharp 2002; Scherr *et al.* 2003; Kim and Rossi 2007) ou par synthèse de petits ARN interférents (siRNA) consistant en 19-27 paires de bases en longueur. L'inhibition des gènes par ces approches est hautement spécifique et bien que leur capacité d'appariement de bases avec les séquences spécifiques d'acides nucléiques complémentaires est similaire, leur mode d'inhibition d'un gène est relativement différente. Les AS-ONs sont pris en charge par l'enzyme Ribonuclease H (RNase H) qui aide à la dégradation de l'ARNm complémentaire cible d'une manière catalytique, ensuite l'AS-ONs est à nouveau libéré pour se lier avec un

autre ARNm cible (Walder and Walder 1988, Eder and Walder 1991, Schultz and Champoux 2008, Tadokoro and Kanaya 2009, Sitikov 2012).

Les siRNA synthétiques sont des petits ARN double brin (dsRNA) et sont le substrat du complexe RISC ou RNA induced silencing complex (McManus and Sharp 2002). L'introduction de siRNA initie une cascade puissante de la dégradation spécifique de la séquence d'ARNm cible sur la liaison d'une séquence d'ARNm complémentaire du génome (Wilson and Doudna 2013). Les siRNAs sont des agents très prometteurs en thérapie anticancéreuse. Ils peuvent inhiber un grand nombre de cibles (récepteurs à activité tyrosine kinase, gène anti-apoptotiques et autres gènes de survie cellulaire). De plus, ils peuvent contrecarrer la résistance causée par l'efflux des drogues. En effet, il est peu probable que les siRNA soient expulsés des cellules cancéreuses et certains d'entre eux peuvent inhiber l'expression des protéines d'efflux. De plus, les siRNAs exercent leur activité à des concentrations extrêmement faibles (de l'ordre du pico molaire).

**Sachant que la séquence d'un oncogène de jonction est unique, elle ne se trouve que dans les cellules tumorales et représente une cible spécifique pour des thérapies ciblées type siRNA, nous avons choisi d'appliquer cette technologie innovante au cancer papillaire de la thyroïde qui est la tumeur endocrine la plus fréquente.**

Dans ce contexte, un projet de recherche a été lancé dans l'équipe de Dr Massade à la recherche d'un traitement efficace basé sur l'utilisation de siRNA contre le carcinome papillaire de la thyroïde (PTC). L'exploration d'une nano-médecine efficace contre les oncogènes de fusion RET/PTC exprimée dans les PTC a été le thème principal de mon projet de thèse.

Mais, la délivrance *in vivo* de siRNA est un défi majeur. De plus, l'efficacité biologique du siRNA est entravée par leur demi-vie plasmatique courte (mauvaise stabilité dans les liquides biologiques) et à une faible pénétration intracellulaire (caractère très hydrophile). La délivrance de siRNA dépend de: i) la structure, ii) des modifications et des substitutions chimiques qui affectent sa stabilité dans la circulation sanguine, iii) l'aptitude à s'extravaser dans les vaisseaux sanguins, iv) la bio-distribution, v) la capacité de pénétration intracellulaire et clairance de la circulation (Kanasty *et al.* 2012). Les problèmes d'instabilité et de dégradation doivent être résolus avant d'exploiter la pleine efficacité de siRNA pour l'inactivation des gènes. Les différentes approches utilisées pour délivrer les siRNA à la cible, leurs avantages et inconvénients sont résumés dans l'article de revue (Ali *et al.* 2012).

Afin de protéger les siRNA contre la dégradation et d'améliorer la pénétration intracellulaire, les siRNA RET/PTCs ont été vectorisés par méthode de "squalenoylation" (pour revue voir: Raouane *et al.* 2012, Ali *et al.* 2012). Le squalène (SQ) est un lipide neutre, précurseur du cholestérol, également utilisé dans diverses préparations pharmaceutiques comme excipient. Ce nouveau composé non-cationique a été découvert par l'équipe du Pr. COUVREUR pour préparer des nanoparticules (NPs) (Couvreur *et al.* 2006; Couvreur *et al.* 2008). Ainsi les nanoparticules de SQgem (squalène + gemcitabine) ont été préparées et ont été trouvées plus cytotoxique *in vitro* (Reddy *et al.* 2007) et possèdent une activité anrtinéoplasique plus efficace *in vivo* (Reddy *et al.* 2008a). Nous avons appliqué ce concept innovant pour vectoriser les siRNA thérapeutiques que nous avons mis au point au laboratoire.

**Principaux résultats obtenus au cours de la thèse**

Au Cours de sa thèse, Marie Gibert a conçu et testé l'efficacité et la spécificité des siRNA RET/PTC1 (Gilbert-Sirieix *et al.* 2010). Ensuite, Mouna Raouane a vectorisé les siRNA RET/PTC1 par la méthode de squalenoylation. Brièvement cette technique consiste à coupler d'une manière covalente le siRNA RET/PTC1 au squalène. Le bio-conjugué formé est capable de s'auto-assembler spontanément dans une solution aqueuse pour donner des nanoparticules. Les nanoparticules siRNA RET/PTC1-SQ ont montré des effets inhibiteurs significatifs (70% d'inhibition de la croissance tumorale). De plus, une inhibition de l'expression de l'oncogène et de l'onco-protéine sont observés (Raouane *et al.* 2011). En revanche, aucune efficacité des nanoparticules siRNA RET/PTC1-SQ ont été trouvés *in vitro*. **Nous avons supposé que l'inefficacité des nanoparticules est due à leur incapacité à traverser les membranes cellulaires, comme ils ne sont pas trouvés dans le compartiment intracellulaire par microscopie à fluorescence, sauf une fois transfectées par la lipofectamine 2000.**

Pour surmonter cet obstacle, un peptide fusogénique, le GALA a été choisi ayant montré des résultats intéressants pour améliorer l'internalisation des ONs anti sens (Hughes *et al.* 1996) et les siRNAs (Hatakeyama *et al.* 2009, Sakurai *et al.* 2009, Akita *et al.* 2010, Sato *et al.* 2010, Akita *et al.* 2011). Le GALA interagir avec les membranes cellulaires dans le tissu cible, pour obtenir un meilleur transport transmembranaire et pour améliorer la pénétration intracellulaire de nanoparticules. Ainsi, pour restaurer l'efficacité *in vitro* des nanoparticules siRNA RET/PTC1-SQ, le GALA a été ajouté en tant que GALA-Chol pour améliorer la translocation de nanoparticules jusqu'à la cible.

Afin d'améliorer la pénétration intracellulaire, nous avons combiné les siRNA RET/PTC1 SQ avec le GALA (répétition d'acide glutamique-alanine-leucine- alanine) (Subbarao *et al.* 1987). Le GALA s'incorpore dans la membrane endosomale et la déstabilise suite à un changement conformationel induit par le faible pH endosomal, ce qui favorise l'échappement vers le cytoplasme. Le GALA sous une forme conjugué avec du cholestérol (GALA-Chol) a été synthétisé et fourni par le Pr Hideyoshi Harashima (Laboratory of Innovative Nanomedicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University Kita 12, Japan). Ainsi, le GALA-Chol associé aux nanoparticules squalénées siRNA-SQ RET/PTC1 conduit à la formation de nanoparticules (NPs) siRNA-SQ-GALA-Chol. *In vitro*, les NPs siRNA-SQ GALA-Chol RET/PTC1, à la dose de 50nM sont efficaces et non toxique dans la lignée BHP 10-3 qui exprime RET/PTC1. En microscopie confocale et contrairement aux NPs siRNA-SQ RET/PTC1, les NPs siRNA-SQ GALA-Chol RET/PTC1 sont capables de franchir la membrane cellulaire et se situent dans le cytoplasme.

Ensuite, des expériences chez l'animal ont été effectuées. Les NPs siRNA RET/PTC1-SQ ainsi que les NPs siRNA-SQ GALA-Chol RET/PTC1 ont été injectés à des souris nudes porteuses de tumeurs xénogreffées par BHP-10 soit par voie intraveineuse (*i.v.)* soit par voie intratumorale (*i.t.*). Après sacrifice des souris, l'expression de RET/PTC1 par RT-qPCR et par Western blot dans les tumeurs.

Les résultats montrent que seules les NPs siRNA RET/PTC1-SQ sont capables d'inhiber la croissance tumorale et l'expression de RET/PTC1. Donc le GALA améliore l'internalisation des NPs siRNA RET/PTC1-SQ *in vitro* mais n'a aucune activité antinéoplasique *in vivo* probablement dû à une agrégation des NPs siRNA RET/PTC1-SQ+GALA dans la circulation sanguine.

**En conclusion, les nanoparticules siRNA-squalène sont définitivement accréditées pour délivrer les siRNA thérapeutiques et permettent de diminuer les doses de siRNA tout en maintenant leurs efficacités antinéoplasiques.**

Dans la deuxième partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'oncogène de jonction RET/PTC3 qui est à l'origine du cancer radio-induit agressif de l'enfant, observé avec une incidence élevée dans les zones fortement exposées aux radiations ionisantes après l'accident de Tchernobyl. Il résulte de l'activation de RET par recombinaison au gène ELE1 suite à des irradiations précoces.

A notre connaissance, aucune lignée de cellules humaines exprimant RET/PTC3 n'a été établie. Dans un premier temps**,** nous avons établi une lignée cellulaire exprimant l'oncogène RET/PTC3 par transfection stable d'un plasmide d'expression exprimant RET/PTC3 dans la lignée NIH-3T3 issue de fibroblastes de souris **(baptisée RP3).**

La lignée RP3 a été caractérisée pour sa tumorigénicité chez la souris nude. Nous montrons que l'injection en sous-cutanée des cellules RP3 engendre le développement de tumeurs en 15 jours chez la souris nude qui confirme l'acquisition du phénotype tumoral.

Ensuite, quatre siRNA ciblant la jonction RET/PTC3 ont été dessinés et synthétisés, le plus efficace inhibe de 80% l'expression de l'ARNm de RET/PTC3 et diminue significativement l'expression de la protéine RET. Nous montrons que le siRNA RET/PTC3 est spécifique de la séquence RET/PTC3 car il est inefficace sur des lignées cellulaires exprimant l'oncogène RET/PTC1 (lignées de carcinome papillaire de la thyroïde TCP-1 et BHP10-3). Dans la lignée RP3, le siRNA RET/PTC3 inhibe la viabilité cellulaire (test MTT), la migration et l'invasion cellulaire (recolonisation de brèche sans et avec Matrigel$^{TM}$ respectivement, suivi d'une analyse en Incucyte$^{TM}$), bloque les cellules en phase G0/G1 (cytométrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium) et induit l'apoptose (clivage de la caspase-3 et de PARP observés en Western blot). Ensuite, le siRNA RET/PTC3 a été vectorisé par squalénisation. Le siRNA RET/PTC3 couplé au squalène et administré sous forme de nanoparticules inhibe fortement la croissance tumorale et diminue l'expression de l'oncogène et de l'oncoprotéine (Ali *et al.* 2014b).

**En conclusion, nous avons établi un modèle cellulaire (RP3) qui exprime l'oncogène de jonction RET/PTC3, qui est tumorigène chez la souris athymique. Nous avons défini des siRNA RET/PTC3 efficaces et spécifiques RET/PTC3 qui, administrés *in vivo* sous forme de nanoparticules, inhibent fortement la croissance tumorale et diminuent l'expression de l'oncogène et de l'oncoprotéine.**

**Discussion**

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons montré que les nanoparticules siRNA RET/PTC1-SQ combinées au GALA-Chol sont inefficaces *in vivo* mais augmentent l'internalisation du siRNA RET/PTC1 *in vitro*. Pour expliquer le désaccord entre résultats *in vitro* et *in vivo*, nous devons considérer les molécules présentes dans le microenvironnement des fluides physiologiques. *In vivo*, les nanoparticules se trouvent dans un milieu riche en protéines *e.g.* des immunoglobulines, des protéines du complément, des

facteurs de coagulation, l'albumine, le fibrinogène et des facteurs de développement (Saptarshi *et al.* 2013). Ainsi, en raison de leur grande taille et du rapport surface-masse, les NPs forment des complexes Bio/Nano en interagissant avec des protéines et des biomolécules ou, avec d'autres acides nucléiques, des lipides et même avec des métabolites (Saptarshi *et al.* 2013). Les nanoparticules adsorbent sélectivement différents peptides et d'acides aminés sur leur surface pour former des coronas NPs-protéines par des interactions moléculaires entre des groupes chimiques des surfaces des nanoparticules et des résidus d'acides aminés. Ces composants absorbés sur les NPs modifient leurs propriétés de forme et de surface, ce qui pourrait accroître ou réduire la capacité de délivrance et donc le devenir ultime du nano-agent (Xia *et al.* 2010). Les interactions protéiques affectent également la pénétration cellulaire, l'accumulation, la dégradation et l'élimination des NPs de la circulation (Saptarshi *et al.* 2013). Pour cette raison, il est ainsi possible que les nanoparticules associées au GALA-Chol forment des agrégats avec des composantes sériques ce qui expliquerait la discordance entre les résultats *in vivo* et *in vitro*.

Comme mentionné précédemment, les nanoparticules interagissent avec les composants complexes de fluides naturels (Saptarshi *et al.* 2013). Cette interaction nano-bio pourraient entraver la quantité absolue de nanoparticules à être livré à la cible ce qui permet de réduire considérablement la cinétique de libération des oligonucléotides des nanoparticules.

Pour cela, des études de pharmacocinétique et de bio-distribution seront nécessaires pour comprendre le devenir des NPs siRNA-SQ. Nous supposons que ces nano-vecteurs sont capables de traverser le réseau vasculaire qui est désorganisé dans la tumeur et rendu par ce fait, plus perméable par rapport aux tissus sains. De plus, le système lymphatique tumoral est souvent compromis. Cet effet de perméabilité et de rétention tissulaire appelé EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) (Maeda *et al.* 2013) permet une vectorisation passive c'est-à-dire, un effet spontané de translocation des nanoparticules de taille inférieure à 200 nm à travers la paroi des vaisseaux néoformés de la tumeur. Dans le cas où les études de biodistribution montrent une accumulation importante dans les organes d'épuration, nous pouvons envisager de PEGyler les nanoparticules (Jokerst *et al.* 2011) pour empêcher les phénomènes d'opsonisation afin de réduire la capture massive des nanoparticules par le système réticulo-endothélial et par conséquent favoriser leur accumulation sélective au niveau de la tumeur (Brigger *et al.* 2001). Des modifications structurelles peuvent être aussi envisagées en liant les nanoparticules soit à la transferrine (Bartlett and Davis 2007) soit à

des anticorps ciblant exclusivement les cellules tumorales [Avastin (bevacizumab) ou Herceptin (trastuzumab), des anticorps monoclonaux spécifiques contre le VEGF (Lee *et al.* 2000) ou l'HER- 2 (Izumi *et al.* 2002)].

Dans la seconde partie du travail, nous avons établi une nouvelle thérapie contre l'oncogène de jonction RET/PTC3 par siRNA et montré la spécificité du traitement en ciblant les deux gènes partenaires de la jonction RET et ELE1 et non seulement RET. Nous avons entrepris cette démarche car un siRNA dirigé uniquement contre RET pourra également inhiber l'expression de RET dans les tissus normaux, y compris les poumons, les systèmes nerveux, uro-génital et hématopoïétiques (Mulligan 2014). Le siRNA RET/PTC1 a été utilisé comme contrôle non spécifique des cellules RP3 (exprimant l'oncogène de fusion RET/PTC3). Les effets non inhibiteurs du siRNA RET/PTC1 dans la lignée cellulaire RP3 montre que le ciblage est spécifique contre la séquence d'oncogène de jonction. *Vice versa*, le siRNA RET/PTC3 est également incapable d'inhiber RET/PTC1 dans les lignées cellulaires BHP 10-3 et TPC-1 (exprimant oncogène de fusion RET/PTC1). Ainsi, nous avons conclu qu'un siRNA ciblé spécifiquement contre la séquence de jonction (y compris à deux parties de gène participant) est nécessaire pour provoquer des effets inhibiteurs efficaces contre l'oncogène de jonction et également d'éviter une inhibition de type sauvage du gène RET dans d'autres systèmes.

A la recherche des conséquences biologiques de l'inhibition de RET/PTC3, nous avons constaté que le siRNA RET/PTC3 à des effets doubles; inhibition de la croissance cellulaire par un blocage de cycle cellulaire en phase G0/G1 et également induction de la mort cellulaire par apoptose et/ou par nécrose. Dans notre étude, la mort cellulaire a été trouvé être induite par le siRNA RET/PTC3 par clivage de la caspase-3 et de PARP-1. Ceci démontre que le traitement par siRNA provoque la fragmentation de l'ADN qui conduit à l'activation de la machinerie de la mort cellulaire dans les cellules tumorales, d'abord par voie apoptotique et dès que les effets siRNA persistent pendant un certain temps, il active ensuite les voies nécrotiques. Ces résultats ont été observé par d'autres auteurs dans plusieurs modèles cellulaires cancéreux, notamment de fibro-sarcome L929 (Schulze-Osthoff *et al.* 1994), et d'adénocarcinome colique HT29 (Wilson and Browning 2002, Meurette *et al.* 2007 ). Par conséquent, nous avons conclu que le siRNA provoque la mort cellulaire par une combinaison des deux voies; l'apoptose et la nécrose. Tant que, la mort cellulaire est induite par la stimulation des récepteurs de mort par leurs ligands spécifiques, il pourrait être intéressant d'étudier, si le traitement par siRNA est capable de modifier l'expression de

récepteur de l'apoptose (CD95/Fas), de la nécrose (TNFR = tumour necrosis factor receptor) et/ou leurs ligands respectifs (TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand, FASL or CD95L, TNFα = TNF ligand). En plus, les TRAIL (Frew *et al.* 2008, Bernardi *et al.* 2011, Bernardi *et al.* 2012, Dimberg *et al.* 2013) ainsi que le CD95 (Martin-Villalba *et al.* 2013) sont déjà utilisés comme thérapie anti-tumorale et outil thérapeutique potentiel pour diverses tumeurs malignes et quelques thérapies à base de TRAIL sont en phase I ou II en essais cliniques (Bellail *et al.* 2009, de Wilt *et al.* 2013, Gasparini *et al.* 2013, Stuckey and Shah 2013). Par conséquent, ils pourraient également être utilisés en association avec le siRNA pour tester l'efficacité de cette thérapie combinée.

L'ensemble des résultats obtenus sur RET/PTC1 et RET/PTC3 montrent que nos siRNA mis au point auraient des applications thérapeutiques. Les expériences préalablement effectués au laboratoire montrent une inhibition significative (~70%) de gène RET/PTC1 par les siRNA RET/PTC1-SQ NPs lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse à la dose cumulative de 2.5 mg/kg/souris (Raouane *et al.* 2011). Même à une dose 5 fois moins importante (0.5 mg/kg/souris) une inhibition significative de la croissance tumorale (Ali *et al.* 2014a) dans les tumeurs porteuses de RET/PTC1 a été montrée. Pour RET/PTC3, la dose de 2.5 mg/kg/souris a été choisie car l'oncogène de jonction RET/PTC3 est plus agressif et plus métastatique (Ali *et al.* 2014b). L'inhibition de la croissance tumorale, même à partir de la première injection de siRNA RET/PTC3 NPs montre l'efficacité de cette thérapie ciblée. Les effets persistants des nanoparticules siRNA RET/PTC1-SQ ou siRNA RET/PTC3-SQ sur l'inhibition de la croissance tumorale pendant plusieurs (7-9) jours après la dernière injection, montre la stabilité du système qui préserve les siRNA de la dégradation.

**Conclusions :**

1. Les deux siRNA RET/PTC1 et RET/PTC3 sont efficaces et spécifiques contre leur propre oncogène de jonction.
2. L'oncogène de jonction RET/PTC3 est capable de transformer les fibroblastes embryonnaires de souris NIH/3T3.
3. *In vitro,* les nanoparticules siRNA RET/PTC-SQ ne sont pas capables de traverser la membrane cellulaire et sont donc inefficace sur l'inhibition de l'oncogène et de son oncoprotéine, sauf si transfectées avec lipofectamine 2000.
4. *In vitro*, le GALA-Chol favorise l'internalisation des nanoparticules siRNA RET/PTC1-SQ et la libération du siRNA RET/PTC1 qui se traduit par une efficacité de

l'inhibition de l'oncogène et de l'oncoprotéine RET/PTC1 mais il s'agrège *in vivo* aux protéines et rend les nanoparticules siRNA RET/PTC1 inefficaces.

5. Les deux nanoparticules (siRNA RET/PTCs-SQ NPs) sont efficaces *in vivo*, ils inhibent la croissance tumorale, réduisent l'expression de l'oncogène et l'oncoprotéine RET/PTCs.
6. Les nanoparticules de siRNA RET/PTC1-SQ inhibent la croissance tumorale, même à une dose cinq fois moins importante (de 0.5 mg/kg/souris) que les résultats publiés antérieurement (de 2.5 mg/kg/ souris).
7. Les nanoparticules de siRNA RET/PTC3-SQ induisent la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* par clivage de la caspase-3 et PARP-1 et restaurent partiellement la différenciation *in vivo* (diminution de marqueur Ki67).

**Perspectives :**

1. Des concentrations plus faibles de GALA-Chol seront testées pour vérifier leur efficacité *in vitro* et *in vivo* afin d'empêcher l'agrégation des nanoparticules aux protéines sériques.
2. Plusieurs protocoles de traitement par les nanoparticules siRNA RET/PTC-SQ seront testés afin de pouvoir améliorer la régression tumorale (*e.g.* des concentrations plus faibles en siRNA-SQ NPs, des injections plus espacés de siRNA-SQ NPs à des concentrations plus fortes).
3. Dans le but de comprendre la disponibilité des nanoparticules dans l'organe cible, la bio-distribution des nanoparticules sera étudiée dans les organes ainsi que le tissu tumoral.
4. Dans le but d'améliorer le traitement des carcinomes papillaires de la thyroïde, les siRNA RET/PTCs-SQ NPs devraient être combinés avec $^{131}$I et/ou un inhibiteur de VEGF.
5. L'approche pharmacologique par siRNA-SQ NPs devrait être étendue à d'autres pathologies cancéreuses porteuses d'oncogène de jonction (*e.g.* TMPRSS2/ERG dans le cancer de la prostate).

**Retombées cliniques :**

Sachant que les oncogènes RET/PTC1 et RET/PTC3 représentent le *quasi* majorité des réarrangements RET observés dans les cancers papillaires de la thyroïde, leur inhibition par des siRNA permettrait d'introduire une nouvelle thérapie pour les patients réfractaires aux traitements actuels. L'avantage d'utiliser la méthode de squalénisation par rapport à celle des

lipides cationiques pour délivrer les siRNA RET/PTCs est d'avoir un ratio en charge efficace (siRNA/squalène) de 1/1 (mole/mole) permettant ainsi de livrer plus de produit actif. Notre but ultime serait d'introduire dans les années qui suivent une nano-médecine à base de siRNA RET/PTC-squalène en phase clinique.