



Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences chimiques

Par **Phanélie PERCHE**

# Synthèse et évaluation d'oligonucléotides conjugués à des polyamines

Soutenue publiquement le 26 Novembre 2010

Membres du jury :

M. François Morvan, Dr, Montpellier

Rapporteur externe

M. Pierre Vierling, Dr, Nice

Rapporteur externe

M. Mir Wais Hosseini, Pr., Strasbourg

Examineur

M. Alain Laurent, Dr, Grenoble

Examineur

M. Jean-Serge Remy, Dr, Strasbourg

Examineur

M. Mitsuharu Kotera, Dr, Strasbourg

Directeur de thèse









Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences chimiques

Par **Phanélie PERCHE**

# Synthèse et évaluation d'oligonucléotides conjugués à des polyamines

Confidentiel

Soutenue publiquement le 26 Novembre 2010

Membres du jury :

M. François Morvan, Dr, Montpellier

Rapporteur externe

M. Pierre Vierling, Dr, Nice

Rapporteur externe

M. Mir Wais Hosseini, Pr., Strasbourg

Examineur

M. Alain Laurent, Dr, Grenoble

Examineur

M. Jean-Serge Remy, Dr, Strasbourg

Examineur

M. Mitsuharu Kotera, Dr, Strasbourg

Directeur de thèse



Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Génétique, sous la direction du Dr Mitsuharu Kotera.

Je tiens en premier lieu à remercier les Dr Jean-Paul Behr et Jean-Serge Remy pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Merci M. Behr pour nos rares mais précieuses discussions où vous avez su me ré-inoculer le virus de la recherche par votre passion et votre curiosité inextinguibles. Merci Jean-Serge d'avoir su créer une ambiance aussi chaleureuse au sein du laboratoire, merci pour ton encadrement sur l'aspect « biologie » de cette thèse, ta participation à la correction du présent manuscrit et tes conseils pour ma vie professionnelle.

Je veux également remercier mon directeur de thèse, Mitsuharu Kotera pour son encadrement au cours de ces trois ans ainsi que sa participation à la correction de cette thèse. Merci Mitsu d'avoir su me transmettre l'esprit de rigueur scientifique et l'amour du travail bien fait.

Je remercie chaleureusement les membres du jury : le professeur Mir Wais Hosseini, les docteurs François Morvan, Pierre Vierling et Alain Laurent de me faire l'honneur de juger ce travail. Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à Alain Laurent qui, en m'initiant aux joies de la recherche, m'a convaincue définitivement de faire cette thèse.

Je veux remercier Cyril Antheaume pour son aide en RMN, Jean-Marc Strub, Patrick Wehrung et Pascale Buisine, pour la réalisation des spectres de masses, ainsi que Nathalie Hammerschmidt et Marianne Erhardt.

À toutes les personnes que j'ai été amenée à côtoyer au laboratoire au cours de ces trois ans, je souhaite exprimer ma reconnaissance. En premier lieu, Liliane, la petite « fée » du labo pour m'avoir aussi bien materné : merci pour les innombrables services rendus (administratifs/logistiques/personnels), nos discussions et ton aide pour mes tricots. Je remercie également Guy, avec son air rêveur et son sourire qui en disent plus longs que bien des discours, Marc, pour m'avoir formé à la biologie cellulaire et à l'électrophorèse sur gel et pour la réalisation des expériences de correction de l'épissage alternatif.

Un grand merci aussi à tous les non-permanents : Émilie, Béné, Audrey et PEP, Nezha (Neeezhaaaaa), Rkia et Régis (Réglisse), avec qui il faisait bon discuter autour d'un verre les soirs d'été, Gaëlle (Gayelle !) pour toutes nos petites discussions/conseils aux pauses

déjeuners et ton soutien pendant la rédaction et Clément (ou Steven) parce qu'avec toi, contrairement à ton expression favorite, on rigole tous les jours. Un immense merci aussi à Jérôme, pour ton charisme pour initier toute sorte d'événements, Jérémy pour la synthèse des siRNAs lipophiles, tes coups de main spontanés quand tu voyais que j'étais débordée et ton caractère attentionné, David, pour ta bonne humeur communicative, Alex, mon partenaire de Lindy préféré, Théo, pour ta convivialité et ta générosité « bien de l'ouest »...et Manue. Manue, je pourrais écrire une thèse sur toutes les raisons que j'ai de te remercier ! Ça me manquera de ne plus t'avoir à mes côtés pour travailler.

Je souhaite également remercier les personnes de Polyplus, et en particulier Marie-Élise pour nos petites discussions, les bowlings et laser game, Valérie, pour son aide pour la réalisation des  $T_m$  et nos papotages, le soir, autour du spectro et Gaëlle, pour nos cours de lindy.

Je remercie aussi dans le désordre les membres des différents laboratoires, avec qui il était très agréable de discuter, autour d'un café ou au détour d'un couloir : les Miko (Matthieu, les inséparables : Laure, Aurélia et Samira, Antoine, Hélène, Geoffrey, Cédric et toute l'ancienne génération), M. Schuber, Béatrice, Isabelle et Hélène (merci pour les expériences de filtration sur gel). Je veux aussi saluer Catherine, Aïcha, les deux Carole (Schanté et la musicienne), Christophe Marcic, et les deux Stéphane du COA (pour leur humour irrésistible).

Bien évidemment, je ne peux que remercier les participants des foot/barbecues d'été : Pape, Wassim, Étienne, Nico, Nigel, Christophe, Philippe, Fred, Yann, Raoul, Paco, Émilie...

Enfin, mes remerciements les plus profonds vont à mes parents et à ma famille, pour m'avoir supportée et soutenue pendant ces trois ans, malgré mon humeur, variant au gré des aléas de la recherche. De la même façon, je veux témoigner toute ma reconnaissance à Nico. Merci pour ta présence constante dans les moments de doute, ta confiance infaillible et ton soutien indéfectible. Je te dédie cette thèse.

Merci à toutes les personnes que j'oublierais et qui ont contribué à rendre agréable mon séjour sur Strasbourg.

À ma famille,  
À mes amis,  
À Nico

*« Dans la recherche commune des arguments, celui qui est vaincu a gagné davantage, à proportion de ce qu'il vient d'apprendre. »*

Épicure



# Table des matières



<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Utilisation des acides nucléiques à but thérapeutique</b>	<b>5</b>
<i>I. L'information génétique</i>	7
A. Structure de l'ADN	7
B. L'ADN : précurseur de la synthèse des protéines	8
1. Première étape : synthèse de l'ARNm	9
2. Deuxième étape : traduction de l'ARNm en protéines	11
<i>II. Utilisation de l'information génétique</i>	12
A. Utilisation des acides nucléiques pour des applications diagnostiques	13
1. La PCR (Polymerase Chain Reaction)	13
2. Les puces à ADN	14
B. Utilisation des acides nucléiques à des fins thérapeutiques	15
1. Ciblage de l'ADN double brin	16
2. Ciblage de l'ARN	17
C. Limites à l'utilisation thérapeutique des acides nucléiques	25
<i>III. Délivrance des acides nucléiques</i>	27
A. Les vecteurs viraux	27
1. Les rétrovirus	28
2. Les adénovirus	29
3. Les virus adéno-associés	29
4. Autres approches	30
5. Avantages et inconvénients des vecteurs viraux	30
B. Les vecteurs synthétiques	30
1. Les liposomes	30
2. Les lipides cationiques	31
3. Les polymères cationiques	32
4. Les dendrimères	34
5. Les peptides de pénétration cellulaire	35
C. Les méthodes mécaniques et physiques	35
1. La micro-injection	35
2. Le bombardement de particules d'ADN	36
3. La méthode hydrodynamique	36
4. L'électroporation	36
5. La sonoporation	37
6. L'irradiation laser	37
7. La magnétofection	37
D. Les modifications chimiques	38
1. Modification de la liaison inter-nucléosidique	39
2. Modification au niveau du sucre	42

3.	Modification des nucléobases	44
4.	Modification de l'enchaînement sucre-phosphate	46
E.	Les oligonucléotides conjugués	48
1.	Les oligonucléotides conjugués à des parties lipidiques	48
2.	Les oligonucléotides conjugués à des carbohydrates	49
3.	Les oligonucléotides conjugués à des CPP	50
IV.	<i>Contexte et objectif de la thèse</i>	51
A.	Contexte	51
B.	Objectif de la thèse	54
<b>Chapitre 2 : Synthèse d'oligonucléotides conjugués à des guanidospermines</b>		<b>57</b>
I.	<i>Introduction</i>	59
II.	<i>Synthèse du synthon spermine</i>	62
A.	Différenciation des amines primaires/secondaires de la spermine	62
B.	Introduction d'un groupement protecteur MMT dosable à 478 nm	65
C.	Incorporation de la fonction réactive : la thiourée	66
D.	Schéma récapitulatif de synthèse du synthon spermine <b>8</b>	67
E.	Validité du synthon <b>8</b> : tests en solution	67
1.	Test de déprotection des groupements Npeoc en solution	67
2.	Test de déprotection des groupements Fmoc en solution	69
III.	<i>Couplage de spermines en 5'</i>	71
A.	Synthèse d'oligonucléotides décamères	71
B.	Introduction d'une amine en 5'	73
C.	Couplage de la spermine <b>8</b> sur un décamère aminomodifié	74
1.	Choix du solvant	75
2.	Choix de l'activateur	76
3.	Choix de la base	78
4.	Choix du temps de réaction	79
D.	Déprotection et purification des oligonucléotides	79
1.	Déprotection des groupements Npeoc et Fmoc	79
2.	Clivage de l'oligonucléotide du support et déprotection des bases	80
3.	Purification des oligonucléotides 5'-guanidospermines	80
E.	Résultats obtenus et limitations	80
IV.	<i>Couplage de spermines en 3'</i>	82
A.	Couplage de spermines sur support dT-CPG	82
1.	Choix du support	82
2.	Introduction de la fonction amine	83
3.	Couplage de la spermine <b>8</b>	85
4.	Synthèse de l'oligonucléotide	86
5.	Déprotection et purification de l'oligonucléotide	87

6.	Résultats obtenus et améliorations potentielles	89
B.	Couplage de spermines sur support sarcosyl-succinyl-CPG	91
1.	Synthèse du support sarcosyl-succinyl-CPG	91
2.	Couplage de la spermine <b>8</b> sur aminohexyl-succinyl-sarcosyl-lcaa-CPG	93
3.	Synthèse d'oligonucléotides	95
V.	<i>Caractérisation des oligonucléotides conjugués</i>	100
A.	Caractérisation par spectrométrie de masse	100
B.	Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance	102
C.	Mesure des températures de fusion	103
VI.	<i>Conclusion</i>	107
<b>Chapitre 3 : Oligonucléotides antisens cationiques appliqués à une correction de l'épissage alternatif</b>		<b>111</b>
I.	<i>Introduction</i>	113
II.	<i>Synthèse des oligoribonucléotides 2'-OMe, phosphorothioates cationiques</i>	113
III.	<i>Caractérisation des oligonucléotides antisens cationiques</i>	115
A.	Caractérisation par spectrométrie de masse et évaluation du rendement	115
B.	Caractérisation par gel d'électrophorèse	116
IV.	<i>Évaluation des oligonucléotides antisens cationiques en biologie cellulaire</i>	118
A.	Pénétration cellulaire des oligonucléotides antisens cationiques	118
B.	Étude de la spécificité et de l'efficacité des oligonucléotides antisens cationiques	119
C.	Étude cinétique de l'activité des oligonucléotides antisens cationiques	123
V.	<i>Conclusion</i>	125
<b>Chapitre 4 : Synthèse et évaluation de siRNAs cationiques lipophiles</b>		<b>127</b>
I.	<i>Introduction</i>	129
II.	<i>Synthèse de siRNAs cationiques lipophiles</i>	130
III.	<i>Caractérisation de siRNAs cationiques lipophiles</i>	132
A.	Spectrométrie de masse	132
B.	Gel d'électrophorèse	133
1.	Détermination des conditions d'hybridation des duplex	134
2.	Caractérisations des oligonucléotides cationiques lipophiles et de leurs témoins	135
C.	Caractérisation par microscopie électronique en transmission	137
1.	Caractérisation des siRNAs cationiques lipophiles	138
2.	Caractérisation de l'interaction siRNAs amphiphiles-Albumine	140
IV.	<i>Évaluation des siRNAs cationiques lipophiles en biologie cellulaire</i>	143
A.	Test de l'efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en l'absence de sérum	145
1.	Efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en fonction de la concentration	145
2.	Efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en présence d'albumine	146

B.	Test de l'efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en présence de sérum	148
V.	<i>Conclusion</i>	149
	<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>151</b>
	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>157</b>
I.	<i>Indications générales</i>	159
A.	Solvants et produits chimiques	159
B.	Point de fusion	159
C.	Résonance magnétique nucléaire (RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ )	159
D.	Spectrométrie de masse	160
E.	Spectroscopie IR	160
F.	Analyse élémentaire	160
G.	Spectroscopie UV-visible et mesure des températures de fusion	161
H.	Méthodes chromatographiques	161
I.	Microscopie Électronique à Transmission d'électrons (MET)	161
J.	Synthèse d'oligonucléotides	162
II.	<i>Synthèse organique en solution</i>	162
A.	Synthèse de la $N^1, N^2, N^3, N^4$ -tétra-TFA-spermine ( <b>1</b> )	162
B.	Synthèse de la $N^1, N^4$ -bis-Boc- $N^2, N^3$ -bis-TFA-spermine ( <b>2</b> )	164
C.	Synthèse de la $N^1, N^4$ -bis-Boc-spermine ( <b>3</b> )	165
D.	Synthèse du 4-nitrophényl 4-nitrophényl carbonate ( <b>4</b> )	166
E.	Synthèse de la $N^1, N^4$ -bis-Boc- $N^2, N^3$ -bis-Npeoc-spermine ( <b>5</b> )	168
F.	Synthèse de la $N^1, N^4$ -bis-MMT- $N^2, N^3$ -bis-Npeoc-spermine ( <b>6</b> )	170
G.	Synthèse de la $N^1$ -MMT- $N^2, N^3$ -bis-Npeoc-spermine ( <b>7</b> )	172
H.	Synthèse de la $N^1$ -(Fmoc-thiourée)- $N^2, N^3$ -bis-Npeoc- $N^4$ -MMT-spermine ( <b>8</b> )	174
I.	Synthèse de la $N^8$ -MMT-octane-1,8-diamine ( <b>9</b> )	176
J.	Synthèse du succinate de $N$ -Fmoc-amino-6-hexanyl ( <b>10</b> )	177
K.	Synthèse du (Fmoc-thiourée)-hexan-1-ol ( <b>11</b> )	178
L.	Synthèse du (Fmoc-thiourée)- $O$ -DMT-oxyhexane ( <b>12</b> )	179
M.	Test de déprotection des groupements Npeoc en solution	180
N.	Test de déprotection des groupements Fmoc en solution	181
III.	<i>Synthèse sur support solide</i>	181
A.	Synthèse d'oligonucléotides couplés en 5' à des guanidino-spermines	181
1.	Synthèse d'oligonucléotides amino-modifiés	181
2.	Couplage des guanidospermines en 5'	183
B.	Synthèse d'oligonucléotides conjugués en 3' (support dT-CPG amino-modifié)	185
1.	Couplage de spermines sur dT-CPG amino-modifiée (1 $\mu\text{mol}$ )	185
2.	Couplage de spermines sur dT-CPG amino-modifiée (20 $\mu\text{mol}$ )	187
3.	Synthèse d'oligonucléotides sur support dT-CPG	189

C.	Synthèse d'oligonucléotides conjugués en 3' (support sarcosyl-succinyl-CPG)	191
1.	Synthèse du support sarcosyl-succinyl-CPG	191
2.	Couplage de la spermine <b>8</b>	193
3.	Synthèse de l'oligonucléotide	194
4.	Test de déprotection des groupements Npeoc sur support solide	196
D.	Caractérisation des oligonucléotides conjugués à des guanidino-spermines	197
1.	Caractérisation en masse	197
2.	Caractérisation par HPLC	197
3.	Mesures des températures de fusion	197
IV.	<i>Synthèse d'oligonucléotides pour correction de l'épissage alternatif</i>	198
A.	Synthèse des oligonucléotides cationiques	198
1.	Synthèse d'oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates conjugués	198
2.	Déprotection des oligonucléotides et décrochage du support	199
3.	Purification des oligonucléotides	199
B.	Caractérisation des oligonucléotides sur gel PAGE	199
C.	Biologie cellulaire	200
1.	Pénétration cellulaire d'un oligonucléotide cationique fluorescent	200
2.	Étude de la spécificité et de l'efficacité des oligonucléotides antisens cationiques	200
3.	Étude cinétique des oligonucléotides antisens cationiques aux concentrations optimales	201
V.	<i>Oligonucléotides lipophiles cationiques</i>	202
A.	Synthèse des siRNAs cationiques lipophiles	202
B.	Caractérisation des oligonucléotides	204
1.	Analyse par gel d'électrophorèse	204
2.	Observations en microscopie électronique en transmission	204
3.	Caractérisation par spectrométrie de masse	205
C.	Biologie cellulaire	205
1.	Expérience en l'absence de sérum	205
2.	Expérience en présence de sérum	206
3.	Analyse de la luciférase et dosage des protéines cellulaires	206
	<b>Abréviations</b>	<b>209</b>
	<b>Liste des figures et tableaux</b>	<b>215</b>
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>221</b>
	<b>Communications et publications</b>	<b>247</b>



# Introduction générale



L'ADN en tant que support de l'information génétique n'a été découvert qu'à partir du milieu du XX<sup>e</sup> siècle. Cette découverte cruciale a eu pour répercussion l'émergence rapide de nouveaux concepts de thérapies, sortant du cadre conventionnel de définition d'un médicament. Au lieu d'agir sur les symptômes d'une maladie génétique, par exemple, il devient envisageable de corriger le désordre génétique incriminé à sa source, en ciblant l'ADN. Les effets d'une telle cure seraient alors définitifs. La thérapie génique a donc constitué le premier axe de recherche sur les thérapies basées sur les acides nucléiques, que ce soit pour remplacer un gène défectueux par un gène sain, introduire un gène supplémentaire pour pallier à une insuffisance, inactiver ou corriger un gène déficient. Bien que le concept soit grisant par le large panel de maladies, souvent incurables, qui pourraient ainsi être traitées, il n'en demeure pas moins de nombreux problèmes de mises en œuvre. En première ligne se trouve la difficulté à amener le gène d'intérêt à son site d'action : le noyau de la cellule. De part sa taille et sa masse, le gène n'est pas un candidat médicament habituel : il faut donc trouver de nouveaux moyens de le vectoriser. Les agents les plus efficaces employés dans ce but sont les vecteurs viraux. Cependant, quoiqu'inactivés, ils peuvent induire une toxicité sévère, liée à une réponse immunitaire ou des modifications de l'expression génétique par une insertion aléatoire dans le génome hôte. De nouveaux vecteurs synthétiques ont alors été développés. Bien que moins efficaces que les vecteurs viraux, ils sont plus sûrs en terme de toxicité et faciles à produire.

L'évolution des connaissances sur les mécanismes d'expression génétique a permis à la fois d'envisager de nouveaux lieux d'action des acides nucléiques et de réduire la taille du principe actif engagé, en ayant recours à des oligonucléotides. Il devient possible d'agir au niveau post-transcriptionnel, en n'agissant non plus sur l'ADN génomique, mais sur l'ARN. En conséquence, ces nouvelles thérapies n'ont plus un caractère aussi définitif qu'en ciblant l'information génétique à sa source, mais présentent davantage de facilité de mise en œuvre. En raison de la complémentarité de séquence des oligonucléotides, ils sont les meilleurs candidats pour le traitement de maladies génétiques. Bien que plus petits que leurs prédécesseurs, leur taille reste plus élevée que les principes actifs classiques, ils doivent donc être vectorisés de façon similaire aux gènes. Le passage de thérapies basées sur un gène à celles reposant sur des oligonucléotides permet toutefois d'imaginer un nouveau moyen d'amener le principe actif à son site d'action. En conjuguant directement sur les acides nucléiques une partie responsable de leur internalisation cellulaire, on peut espérer s'affranchir de tout vecteur.

Le premier chapitre de cette thèse permet donc d'exposer le contexte de ma thèse en faisant un état de l'art de l'utilisation des acides nucléiques, essentiellement dans une optique thérapeutique. Il souligne les enjeux et problématiques liés à leur application : le besoin de les amener intacts à leur site d'action. Il a pour objectif de démontrer qu'avec l'évolution des connaissances des mécanismes qui gouvernent l'expression génétique, la taille des acides nucléiques a pu être réduite du gène à l'oligonucléotide. En parallèle (et en conséquence), la taille des vecteurs développés pour les acheminer vers leur site d'action a évolué de la particule (vecteurs viraux ou synthétiques) vers de simples molécules (conjugaison covalente sur l'oligonucléotide de résidus responsables de leur internalisation cellulaire). Cette dernière approche est celle qui est actuellement développée au laboratoire. Ainsi, une polyamine naturelle, la spermine, peut être couplée répétitivement à l'extrémité 5' ou 3' d'un oligonucléotide par la chimie des phosphoramidites. Cette conjugaison présente des avantages multiples : amélioration de l'interaction entre l'oligonucléotide conjugué et sa cible, obtention d'oligonucléotides de charge globale cationique à pH physiologique et internalisation cellulaire sans agent de transfection.

En raison du grand intérêt que présente cette première génération d'oligonucléotides-polyamines, le deuxième chapitre a pour objectif de développer une nouvelle stratégie de conjugaison en remplaçant le lien phosphate inter-spermine par une liaison guanidine. Les propriétés physico-chimiques de tels composés seront étudiées.

Les troisième et quatrième chapitres de cette thèse traitent de l'utilisation des oligonucléotides-polyamines de première génération pour des applications thérapeutiques : respectivement la correction de l'épissage alternatif et l'ARN interférence.

# Chapitre 1 : Utilisation des acides nucléiques à but thérapeutique



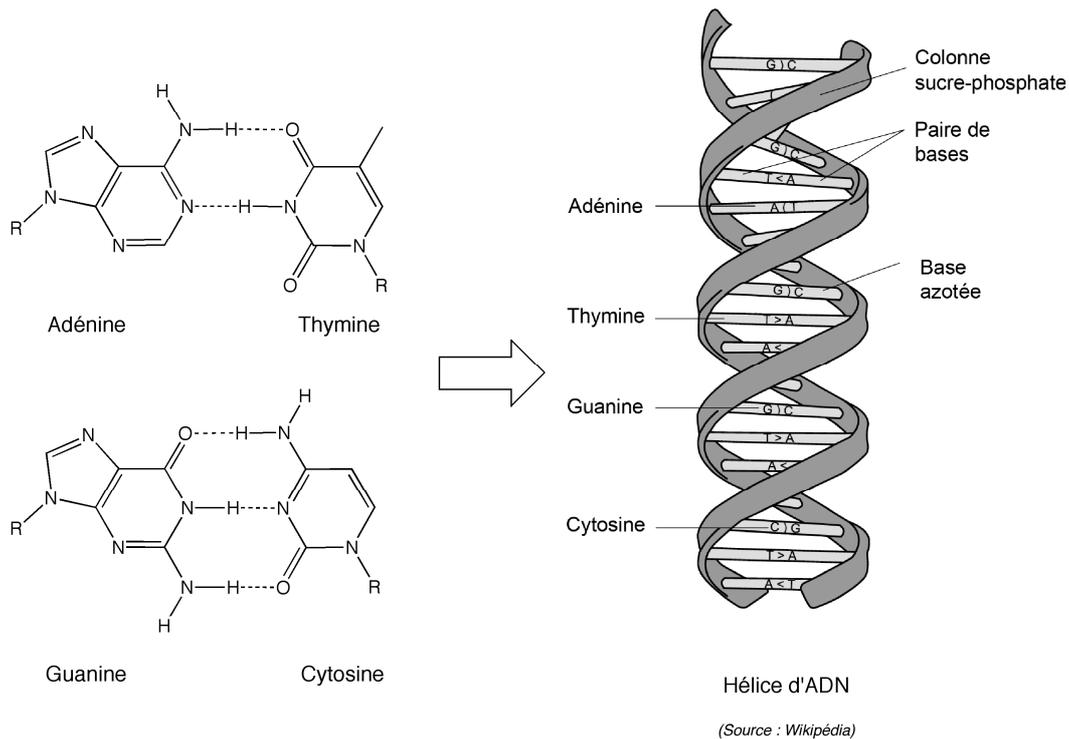
Dans ce chapitre, nous aborderons brièvement les différents mécanismes de transmission de l'information génétique, afin de mettre en valeur les différents niveaux d'intervention possibles pour le contrôle de cette expression génétique : l'ADN double brin (gène), l'ARN pré-messager (pré-ARNm), et l'ARN messager (ARNm). À la lueur de ces mécanismes, nous décrirons de façon non exhaustive les principales applications des acides nucléiques, en insistant sur les utilisations thérapeutiques développées dans ce manuscrit. De même, nous exposerons les différents moyens employés pour les convoier vers leur site d'action, en mettant l'accent sur le sujet principal de cette thèse : la conjugaison covalente d'entités favorisant leur transfection.

## I. L'INFORMATION GENETIQUE

Chaque organisme vivant est constitué d'un ensemble de cellules contenant en leur noyau (pour les cellules eucaryotes) des chromosomes porteurs de l'information génétique. Ces chromosomes comportent des « facteurs » responsables de la transmission de caractères héréditaires : les **gènes**, eux-mêmes constitués d'ADN. L'ADN constitue donc le support premier de l'information génétique.

### A. Structure de l'ADN

La structure de l'ADN proposée par Watson et Crick en 1953 est une double hélice droite antiparallèle où les brins sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes formées entre les bases azotées complémentaires A-T et C-G, comprenant un petit et un grand sillon. Les bases adénine et thymine forment deux liaisons hydrogènes, alors que l'interaction entre la guanine et la cytosine est plus forte, avec 3 liaisons hydrogènes (Figure 1). Deux autres types d'interactions entrent en jeu pour la constitution de cette double hélice : des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les hétérocycles aromatiques des bases, permettant un empilement de ces structures au centre de l'hélice et une répulsion électrostatique entre les phosphates anioniques. Les groupements phosphates, hydrophiles, auront donc tendance à se placer à l'extérieur de la double hélice en milieu aqueux et salin.



**Figure 1 : Interactions de Watson-Crick et structure de l'ADN**

Par la suite, il a été confirmé que la structure décrite par Watson et Crick constitue la conformation majoritaire de la molécule d'ADN (conformation B). Toutefois, des variations du pourcentage en eau du milieu extérieur peuvent entraîner d'autres formes de la double hélice (par exemple : conformation A ou Z). Comme l'avaient déjà suggéré Watson et Crick en 1953 [1], la structure de l'ADN est particulièrement importante puisqu'elle permet la copie du matériel génétique. **Il est ainsi possible d'agir au niveau de l'ADN double brin pour contrôler l'expression d'un gène.**

## B. L'ADN : précurseur de la synthèse des protéines

L'ADN étant le support de l'information génétique, il est la source de l'ensemble des éléments constitutifs d'un organisme. Il va en effet être transcrit en ARNm, intermédiaire de la synthèse des protéines, avant d'être traduit en protéines à l'aide d'un « code génétique » reposant sur les quatre bases A, C, G, T (U pour l'ARN, Figure 2, source : Wikipédia).

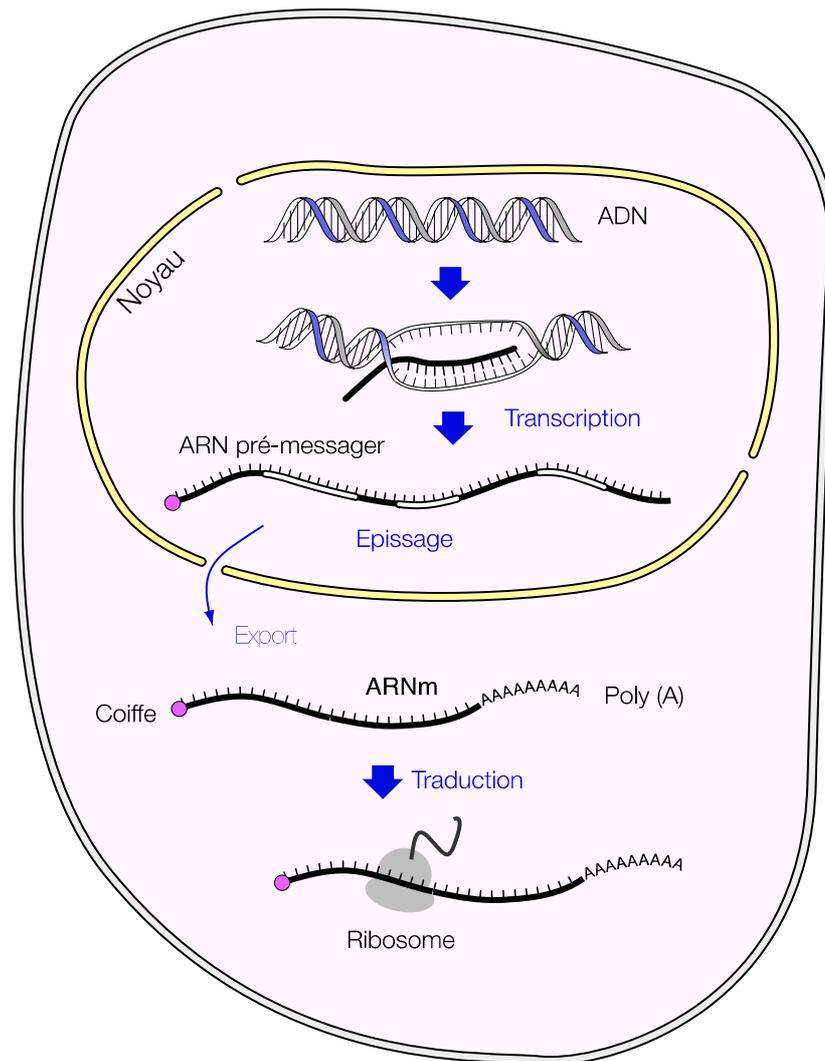


Figure 2 : Schéma général de la synthèse des protéines

### 1. Première étape : synthèse de l'ARNm

Dans les cellules eucaryotes, l'un des deux brins matrices de l'ADN est transcrit en ARN pré-messager (pré-ARNm) de séquence complémentaire (avec une base uracile au lieu de la thymine), dans le noyau, à l'aide d'une enzyme : l'ARN polymérase (Figure 3, source : Wikipédia). Cette enzyme recrute pour cela des substrats nucléosides 5'-triphosphates. Après transcription, la double hélice d'ADN se reforme. **Cet ARN pré-messager contenant l'information génétique, il est possible d'intervenir à ce niveau pour empêcher l'expression d'un gène.**

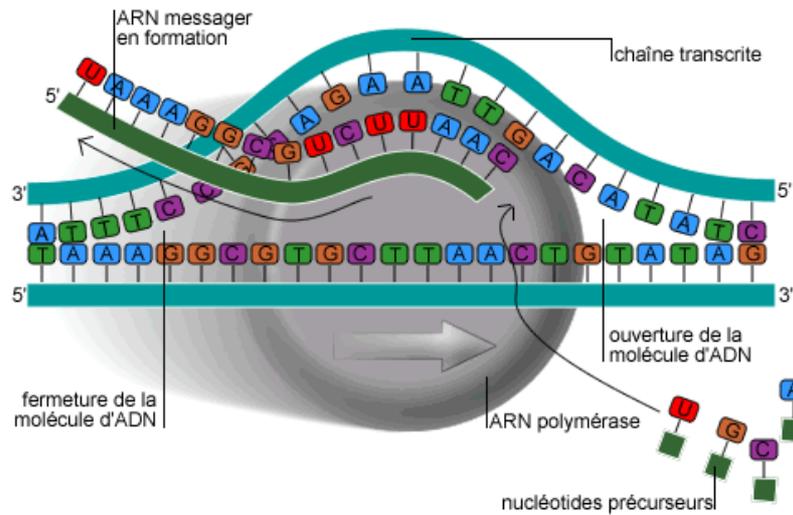


Figure 3 : Étape de transcription

Ce pré-ARNm, simple brin, subit un processus de maturation au cours duquel, il est « coiffé » par des 7-méthylguanosine triphosphates à l'extrémité 5'. Il contient également des parties codantes, les **exons** et des parties non codantes, les **introns**. Afin de former l'ARNm qui permettra la synthèse des protéines dans le cytoplasme, ces introns sont excisés, et les exons sont mis « bout à bout » lors d'une étape appelée **épissage** (Figure 4). Enfin, il est habillé d'une queue poly(A) (50 à 250 nucléotides d'adénine) à l'extrémité 3'.

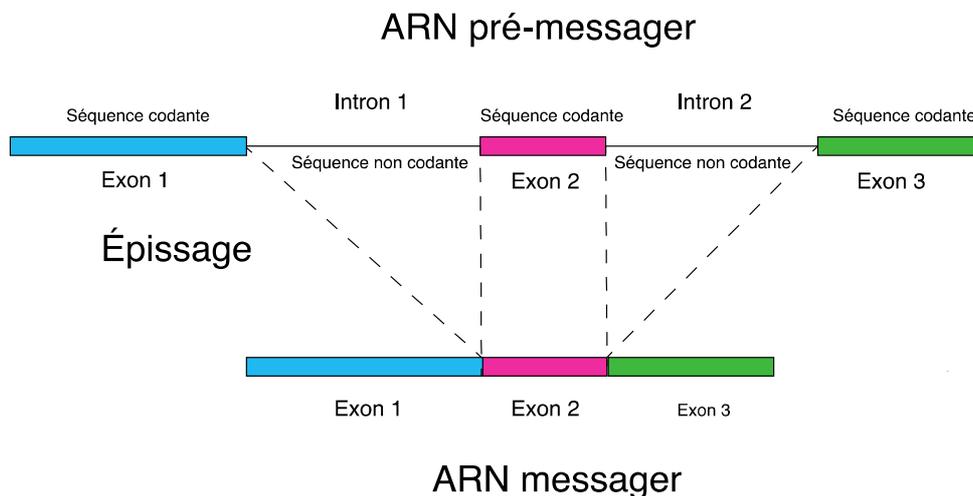


Figure 4 : Épissage du pré-ARNm

Les ARNm résultants sont ensuite exportés vers le cytosol (liquide constituant du cytoplasme) à travers le complexe du pore nucléaire.

## 2. Deuxième étape : traduction de l'ARNm en protéines

La production des acides aminés constitutifs des peptides et protéines est codée par la séquence de l'ARNm. Ainsi, à chaque triplet de nucléotides présentant les bases A, C, G ou U, appelé codon, correspond un acide aminé. En pratique, il n'existe que 20 acides aminés alors qu'il y a 64 combinaisons possibles des bases ( $4^3$ ). Ce code est donc redondant. D'autre part, trois de ces triplets ne codent pas pour des acides aminés mais pour la terminaison de la **traduction** (codons stop). La polymérisation d'acides aminés en protéines s'effectue au niveau du ribosome et se divise en cinq phases principales : liaison du ribosome à l'ARNm, initiation, élongation, terminaison, recyclage des sous-unités. Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique présent sur le réticulum endoplasmique qui va parcourir le brin d'ARNm codon par codon jusqu'à trouver le site d'initiation. L'initiation de la traduction se fait à l'aide d'un codon particulier, le codon AUG, qui permet à la fois le démarrage de la synthèse du polypeptide, et sa traduction en un acide aminé, la méthionine. La traduction ne s'effectue pas directement de l'ARNm en acide aminé, mais nécessite comme intermédiaire un ARN dit « de transfert » (ARN<sub>t</sub>). Sachant que l'ARN de transfert comporte en son extrémité 3' un acide aminé, la reconnaissance codon-anticodon va permettre au ribosome de catalyser la réaction d'allongement de la chaîne peptidique et d'avancer sur le brin de l'ARNm. Les acides aminés sont donc polymérisés dans l'ordre indiqué par l'ARNm dans le sens 5'→3' (Figure 5, source : Wikipédia). Le processus de terminaison intervient lorsque le ribosome arrive au niveau d'un codon stop : la protéine synthétisée est alors libérée.

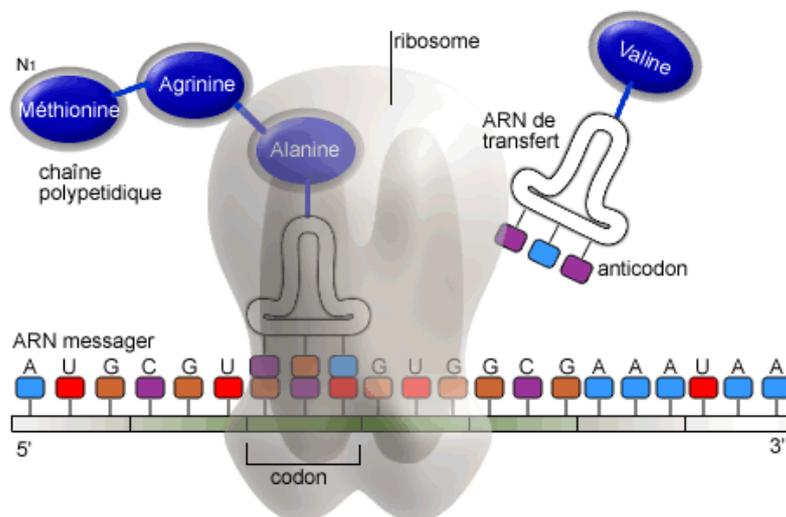


Figure 5 : Traduction de l'ARNm en protéines

**L'ARNm constituant l'ultime étape avant la traduction du matériel génétique, il est possible de le cibler afin de contrôler l'expression génétique.** Son site d'action, le cytoplasme est par ailleurs plus accessible que celui de l'ADN double brin, contenu dans le noyau.

## II. UTILISATION DE L'INFORMATION GENETIQUE

Bien que le propos de cette thèse soit l'utilisation de l'information génétique à des fins thérapeutiques, il est intéressant de noter que les principales applications industrielles des acides nucléiques concernent le domaine du diagnostic. Deux exemples d'emplois des acides nucléiques en tant qu'outils diagnostiques seront donc brièvement abordés. Dans un objectif thérapeutique, en principe, l'intervention au niveau du gène ou de l'ARNm ou pré-messager, que ce soit pour corriger, activer, moduler ou éteindre l'expression d'un gène déficient devrait permettre de traiter un grand nombre de maladies. Si cette intervention a lieu au niveau du « code source » : le génome, il paraît possible, en théorie, de curer ces maladies de façon permanente. Parmi ces pathologies, on retrouve bien évidemment les maladies génétiques, certaines maladies infectieuses mais aussi, et surtout les cancers (Figure 6) [2].

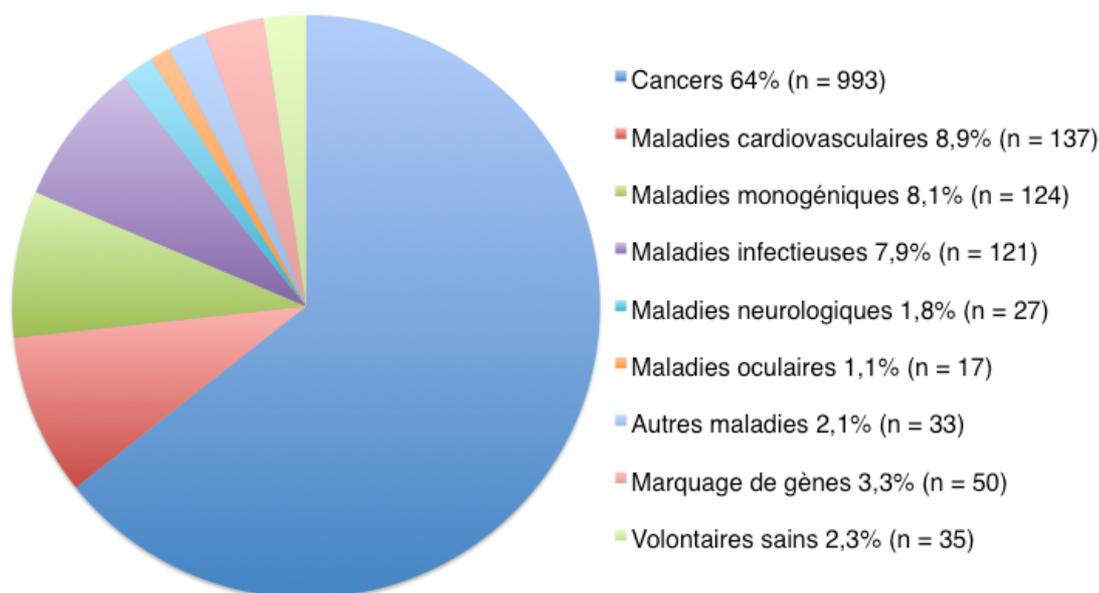


Figure 6 : Répartition des essais cliniques de thérapie génique (2009)

Bien qu'il soit possible d'intervenir à l'aide de « mimes » des acides nucléiques, tels que les MGBs (Minor Groove Binders) [3, 4], les agents thérapeutiques privilégiés restent les acides nucléiques eux-mêmes, puisqu'ils sont capables de dicter la synthèse de protéines dans le cas de l'introduction de gènes ou qu'ils s'apparient parfaitement avec leur cible dans le cas des oligonucléotides. On distingue ainsi deux principaux axes de recherche : l'un consiste à modifier l'information génétique à sa source dans le noyau, en ciblant la double hélice d'ADN, comme dans le cas de la thérapie génique, l'autre consiste à agir au niveau post-transcriptionnel sur l'ARN. Nous nous attacherons donc dans une deuxième partie à présenter de façon non exhaustive un ensemble de stratégies thérapeutiques des acides nucléiques.

## A. Utilisation des acides nucléiques pour des applications diagnostiques

Par leur capacité à se lier de façon extrêmement spécifique aussi bien à leur séquence complémentaire, qu'à d'autres biomolécules (ex : les aptamères), les oligonucléotides s'avèrent de puissants outils de biologie moléculaire ou de diagnostic. Parmi les techniques les plus utilisées dans des processus diagnostiques, on retrouve les méthodes d'amplification des acides nucléiques, telles que la PCR et les méthodes de détection des acides nucléiques, telles que les puces à ADN.

### 1. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique développée par Kary Mullis consistant à répliquer *in vitro* du matériel génétique afin de disposer de quantité suffisante d'acides nucléiques pour une détection ou une caractérisation. Elle intervient par exemple de façon classique dans un processus diagnostique après extraction et purification d'acides nucléiques contenus dans un échantillon biologique (et étape de transcriptase inverse lorsqu'il s'agit d'ARN). Grâce à ce procédé, un fragment d'ADN double brin ciblé peut être amplifié de façon exponentielle à l'aide d'une enzyme polymérase thermorésistante : la Taq-polymérase, de nucléosides triphosphates et de différents cycles de température (Figure 7). Des oligonucléotides (15 à 30 nucléotides) interviennent dans ce processus en tant qu'amorces pour l'enzyme

polymérase en s'hybridant parfaitement à leur séquence complémentaire. Au bout de quelques heures, des millions de copies de la séquence ciblée peuvent être obtenues. La détection des copies d'ADN peut également s'effectuer à l'aide de sondes moléculaires basées sur des acides nucléiques conjuguées à des fluorophores (sondes Taq Man, molecular beacon etc.).

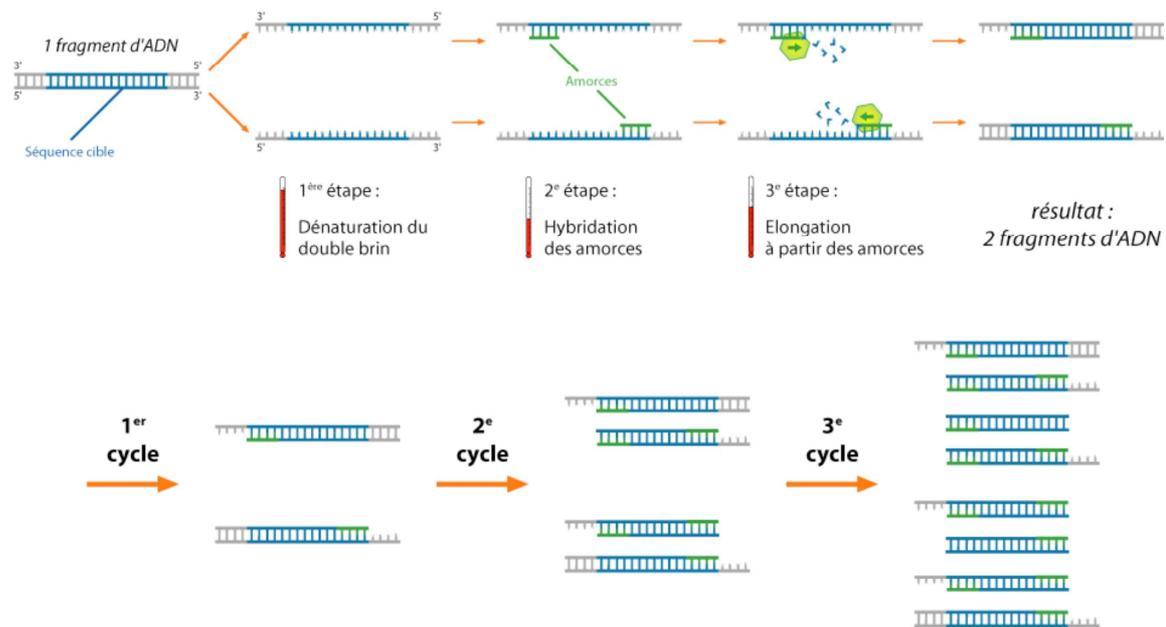


Figure 7 : Amplification d'une séquence cible par PCR

## 2. Les puces à ADN

Les puces à ADN sont utilisées afin de visualiser et mesurer simultanément et rapidement les différences d'expression de milliers de gènes. Le niveau d'expression de gènes d'un échantillon ne prenant de signification qu'en comparaison à une condition de référence, c'est généralement l'expression de gènes de deux extraits de culture cellulaire qui sont comparés sur la même puce. Les puces à ADN utilisent les propriétés naturelles d'un brin d'ADN monocaténaire à s'hybrider de façon spontanée à son brin complémentaire. Ces puces sont obtenues par immobilisation de plusieurs dizaines voire centaines de milliers de sondes ADN sur un support solide. Des ARN extraits d'un échantillon A et ceux d'un échantillon B sont rétro-transcrits en ADN complémentaires correspondants à l'aide d'une enzyme, la

transcriptase inverse. Ces ADN complémentaires sont marqués à l'aide de différents fluorochromes (Cy3 (vert) et Cy5 (rouge)) selon qu'ils proviennent de la culture A ou B. Lorsqu'ils sont mis au contact des sondes ADN immobilisées sur la puce, ils vont s'hybrider avec leurs séquences complémentaires. Par excitation laser aux longueurs d'ondes des deux fluorophores, il est possible de mesurer l'intensité des signaux obtenus afin de quantifier l'expression des gènes.

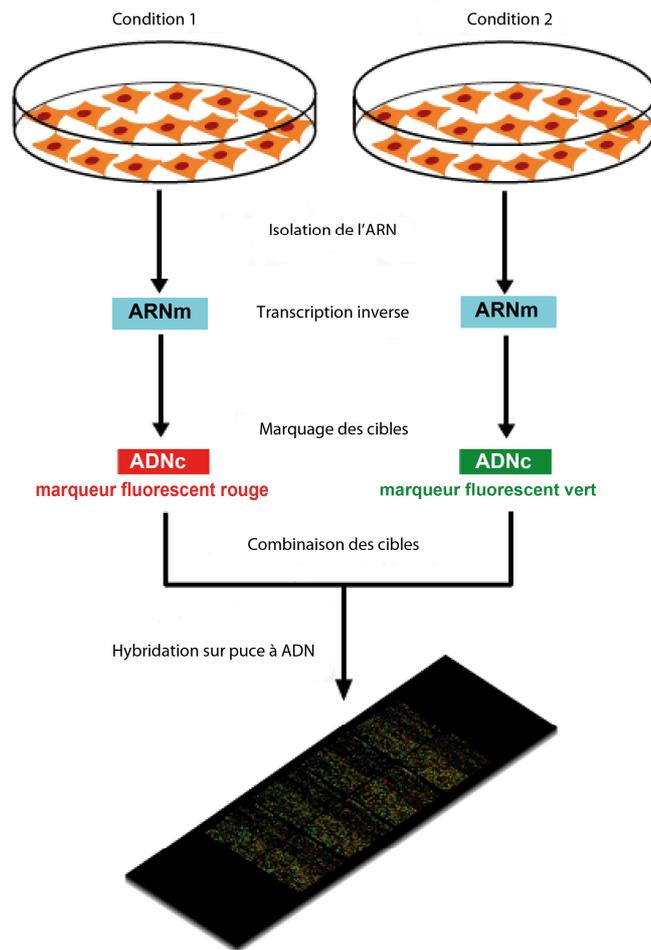


Figure 8 : Principe de la puce à ADN

## B. Utilisation des acides nucléiques à des fins thérapeutiques

Les acides nucléiques font actuellement l'objet de nombreuses recherches à but thérapeutique. Différentes stratégies sont présentées brièvement ici. Seules les applications en ARN interférence et en correction de l'épissage alternatif, étant sujets de cette thèse, seront un peu

plus approfondies (pour une revue détaillée de l'usage des oligonucléotides à buts thérapeutiques voir Opalinska et al., Patil et al.) [5, 6].

## 1. Ciblage de l'ADN double brin

### a. La thérapie génique

Historiquement, la thérapie génique est la première thérapie basée sur les acides nucléiques à avoir été envisagée dès les années 1960, et diverses stratégies de mise en œuvre existent en fonction de l'effet recherché. De façon générale, l'approche la plus commune consiste à insérer un gène normal de façon non spécifique dans le génome de manière à remplacer un gène non fonctionnel. Il est également possible de remplacer un gène anormal par un gène normal à l'aide d'un processus de recombinaison homologe ou de le réparer à l'aide d'une mutation inverse. Le transfert de gènes ne faisant pas l'objet de ce manuscrit, les mécanismes détaillés ne seront pas abordés.

### b. La stratégie antigène : les TFO et l'invasion de brin

La stratégie anti-gène vise directement l'ADN double brin contenue dans le noyau et consiste à empêcher l'étape de transcription (cf. Figure 3). Pour cela, des oligonucléotides ADN simples brins particuliers, de séquences homopuriques ou homopyrimidiques, appelés TFO (pour Triplex Forming Oligonucleotide), sont capables d'interagir avec la double hélice d'ADN par des appariements particuliers, dits de Hoogsteen ou Hoogsteen inverse, formant ainsi une triple hélice. Cette triple hélice se forme dans le grand sillon de l'hélice d'ADN, sur les sites d'initiation de la transcription (Figure 9). Ils bloquent alors l'action de l'enzyme ARN polymérase, provoquant de ce fait une extinction du gène ciblé.



Figure 9 : Triple hélice d'ADN formée à l'aide d'un oligonucléotide

Une autre façon d'empêcher la transcription au niveau de l'ADN génomique consiste à utiliser un oligonucléotide de séquence complémentaire à l'un des deux brins de la double hélice afin qu'il s'apparie à sa cible : il s'agit d'invasion de brin (Figure 10).

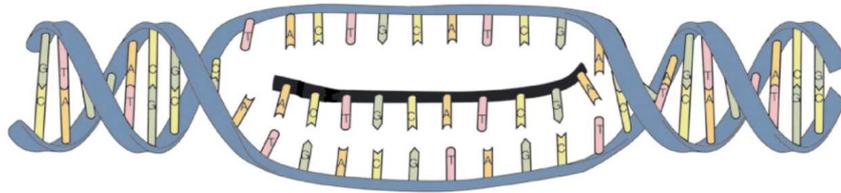


Figure 10 : Représentation d'une invasion de brin par un oligonucléotide

Cette invasion de brin est thermodynamiquement très défavorisée et s'effectue donc difficilement à moins que l'oligonucléotide utilisé présente une affinité accrue pour sa cible. C'est pourquoi des oligonucléotides modifiés de façon à avoir un squelette neutre, comme les PNAs (cf. description p.47), sont souvent utilisés pour cette application [7-9].

## 2. Ciblage de l'ARN

### a. La stratégie antisens

Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides simple brin dont la séquence est complémentaire des ARNm ciblés (Figure 11). Lorsqu'ils sont introduits dans le cytoplasme des cellules, ils ont la faculté de s'apparier avec les ARNm simple brin. La formation d'un tel duplex engendre la reconnaissance par une enzyme, la RNase H, ce qui aboutit à la coupure des brins ARNm correspondants et inhibe la synthèse de protéines [10]. L'oligonucléotide simple brin utilisé peut requérir des modifications pour augmenter sa stabilité (pour un descriptif des différents types de modifications possibles, voir p.38). Toutefois, il faut généralement veiller à ce que ces modifications ne puissent pas inhiber l'activité de la RNase H, bien qu'il soit également possible d'avoir un arrêt de la traduction par simple blocage stérique lié à la formation du duplex oligonucléotide/séquence cible (pour un exemple d'oligonucléotides antisens indépendants de la RNase H voir p. 22). L'approche antisens, largement développée au cours des 30 dernières années risque fort de devenir obsolète avec l'émergence des siRNAs, environ 100 fois plus efficace pour éteindre l'expression d'un gène [11].

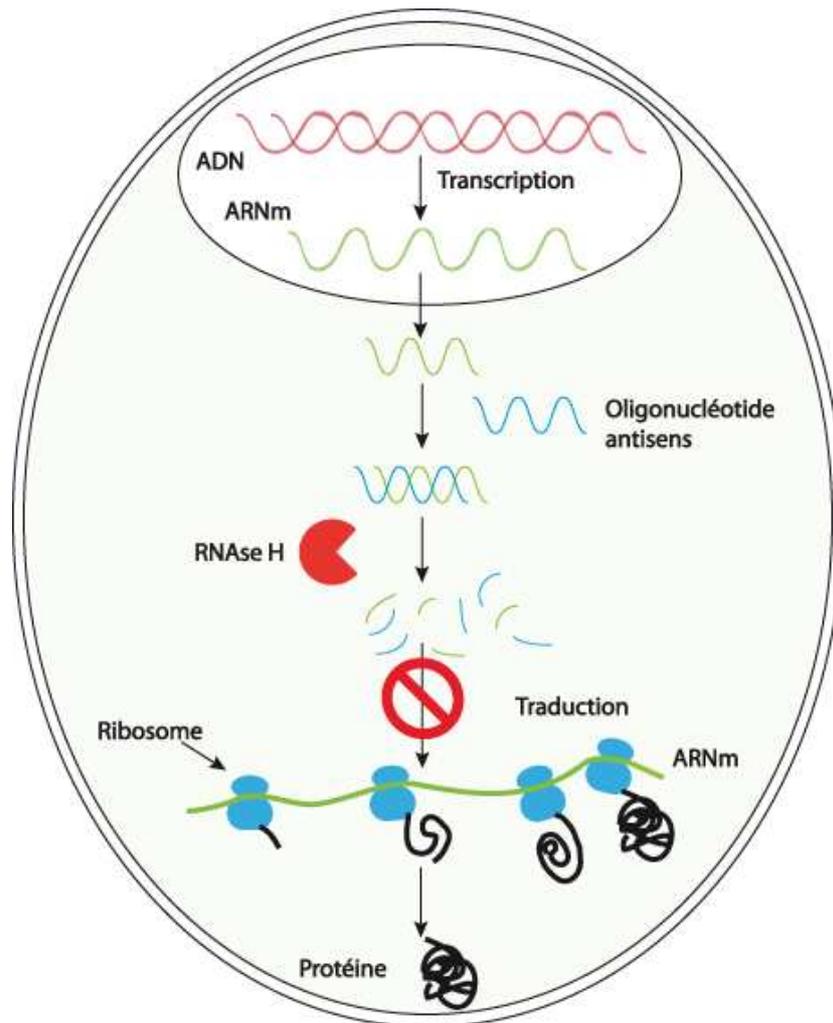
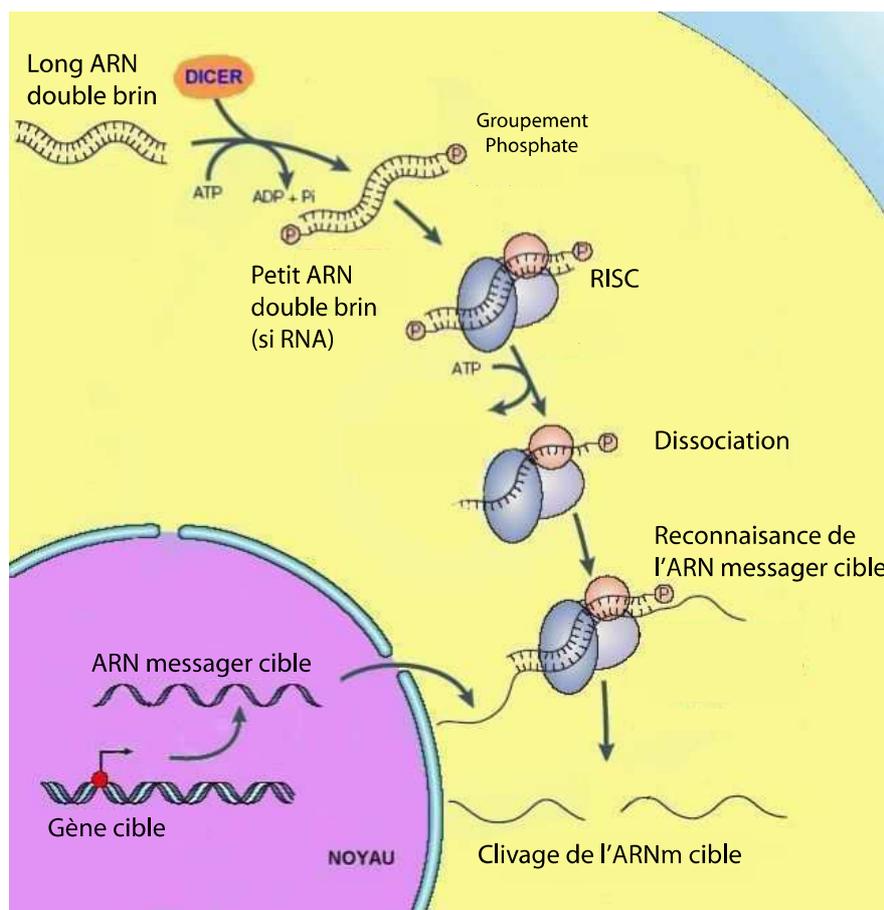


Figure 11 : Principe général de la stratégie antisens

**b.**

**c. L'ARN interférence (siRNAs, miRNAs, shRNAs)**

L'ARN interférence est un mécanisme mis en évidence par Andrew Fire et Craig Mello en 1998, ce pour quoi ils ont reçu le prix Nobel de médecine et de physiologie en 2006. Ces chercheurs ont découvert que l'introduction d'un ARN double brin à l'intérieur de cellules de nématodes *Caenorhabditis elegans* permettait d'éteindre spécifiquement un gène [12] (Figure 12). En 2001, Thomas Tuschl identifie un intermédiaire essentiel de ce mécanisme, présent dans les cellules de mammifères : les siRNAs (pour small interfering RNA), qui sont de petits ARN double brin d'une vingtaine de paires de bases [13, 14], obtenus par éminçage du long ARN double brin. Alors que l'introduction de longs ARN double brin au sein de cellules de mammifères résulterait en une réponse immunitaire de type interféron [15], il devient en revanche possible d'introduire dans le cytoplasme des siRNAs exogènes, facilement synthétisables, pour éteindre l'expression d'un gène ciblé.



**Figure 12 : Mécanisme d'ARN interférence**

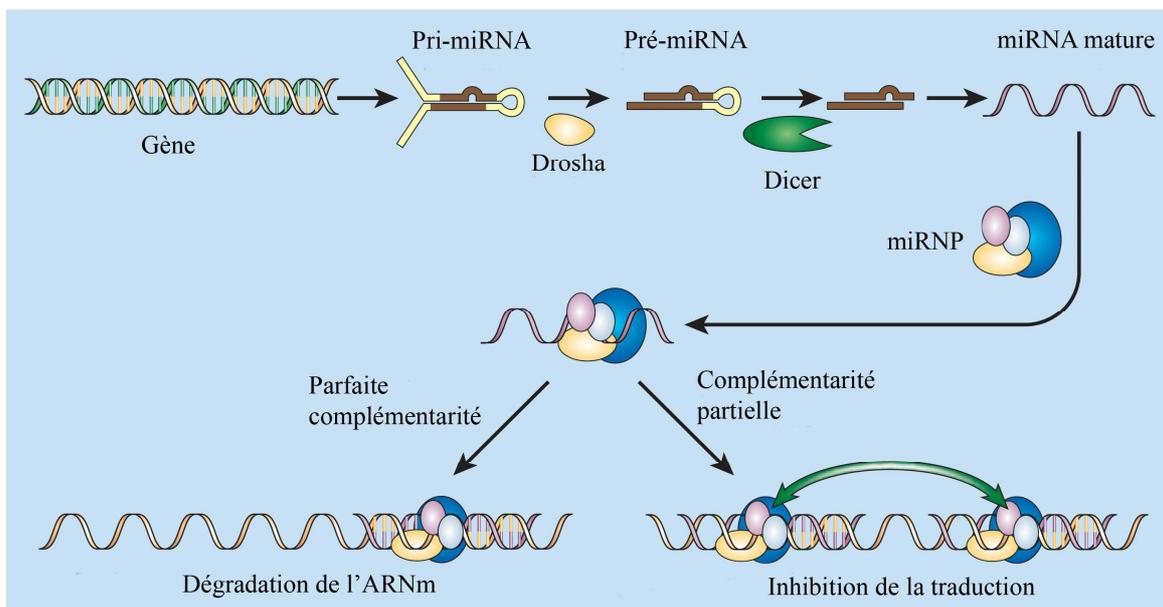
Naturellement, l'ARN interférence s'effectue de la façon suivante : le long ARN double brin est émincé en siRNAs par une ribonucléase, Dicer [16]. Cette enzyme va de plus phosphoryler les siRNAs à chaque extrémité 5'. Dicer est reliée au complexe enzymatique RISC (RNA-induced silencing complex). De façon dépendante de l'ATP, les petits ARN double brin sont ensuite pris en charge par ce complexe RISC qui sépare alors les deux brins pour n'en conserver qu'un, appelé brin antisens. Cette sélection s'effectue du côté thermodynamiquement le plus favorisé [17, 18]. Le complexe RISC ainsi activé va reconnaître les ARNm parfaitement complémentaires du brin antisens et les cliver à l'aide de l'enzyme Argonaute 2 (Ago2) [19]. Ce clivage intervient généralement aux alentours du dixième nucléotide en partant de l'extrémité 5' du brin antisens du siRNA [13]. Ce complexe activé peut ensuite dégrader d'autres ARNm : il s'agit d'un phénomène catalytique. Bien que découvert récemment, les siRNAs profitent des avancées réalisées lors de l'étude de la thérapie génique ou des oligonucléotides antisens. C'est pourquoi ils font déjà l'objet de nombreux tests *in vivo* [20, 21], et de plusieurs essais cliniques (Tableau 1).

Société	Indication	Produit	Cible	Phase clinique
Opko Health	DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge)	Bevasiranib	VEGF	III
Quark Pharmaceuticals / Pfizer	Insuffisance rénale	QPI 1002	p53	II
	Œdème maculaire diabétique	PF-655	RTP801	II
	Neuropathie optique ischémique antérieure non artéritique	QPI 1007	Caspase 2	I
Alnylam	Virus respiratoire syncytial	ALN-RSV01	Gène viral N	II
	Cancer du foie	ALN-VSP	VEGF/KSP	I
	Amylose de la transthyréine	ALN-TTR	Transthyréine	I
Transderm	Pachyonychie congénitale	TD101	Kératine K6a	Ib
Benitec	HIV	BLT-HIV	Multiples	I
Calando pharmaceuticals	Cancer[22]	CALAA01	Polyribonucléotide réductase	I

**Tableau 1 : Essais cliniques en ARN interférence**

D'autres ARNs particuliers, les miRNAs (micros RNA) sont exprimés de façon naturelle par les cellules et permettent d'inhiber l'expression de gènes. Ils se distinguent des siRNAs notamment par leur origine : ils proviennent de longs ARN simple brin repliés en tiges-boucles imparfaites, les pri-miRNAs (miRNAs primaires), qui contrairement aux ARNm ne sont pas destinés à être traduits en protéines. Les pri-miRNAs sont ensuite émincés par la RNase III Drosha [23] en miRNAs plus courts (d'environ 70 bases) : les pré-miRNA (miRNA précurseurs) en forme d'épingle à cheveux, dont la complémentarité de séquence de la tige n'est pas parfaite (Figure 13, d'après Novina et al.) [24]. Après export dans le cytoplasme grâce à l'exportine 5 (protéine de transport) [25, 26], l'extrémité en forme de

boucle de ces pré-miRNAs est coupée par le complexe enzymatique Dicer, qui libère ensuite des miRNAs matures, d'une vingtaine de paires de bases [27]. Ces miRNAs double brin sont déshybridés à l'aide d'une hélicase [28], l'un des deux brins est dégradé alors que l'autre est pris en charge par un complexe ribonucléoprotéique (miRNP), le complexe RISC. Selon que le brin conservé présente ou non une complémentarité de séquence parfaite avec l'ARNm ciblé, il y aura dégradation de l'ARNm, comme pour les siRNAs ou répression de la traduction de l'ARNm en protéine par liaison des miRNAs aux régions 3' non-codantes des ARNm (pour une revue des mécanismes possibles, voir Wu et Belasco) [29].



**Figure 13 : Mécanisme d'ARN interférence par les miRNAs**

À l'inverse des plantes, champignons ou invertébrés [30, 31], les cellules de mammifères ne semblent pas capables d'amplification du phénomène d'ARN interférence médiée par une RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) [32]. Pour cette raison, l'extinction de l'expression d'un gène par des siRNAs exogènes dans ces cellules est transitoire. Afin de remédier à ce problème et ainsi avoir une expression prolongée des siRNAs, il est envisageable de produire ces siRNAs de façon endogène, à l'aide de vecteurs d'expression (vecteurs plasmidiques ou vecteurs viraux) [33, 34]. Deux stratégies sont envisageables : l'une consiste à produire des siRNAs par transcription des deux brins du siRNA (Figure 14-b), l'autre consiste à transcrire des shRNAs (short hairpin RNA, Figure 14-c) [33, 35]. Or cette deuxième méthode semble plus efficace, sans doute parce que la formation des duplex de siRNAs dans les cellules constitue une étape limitante [35].

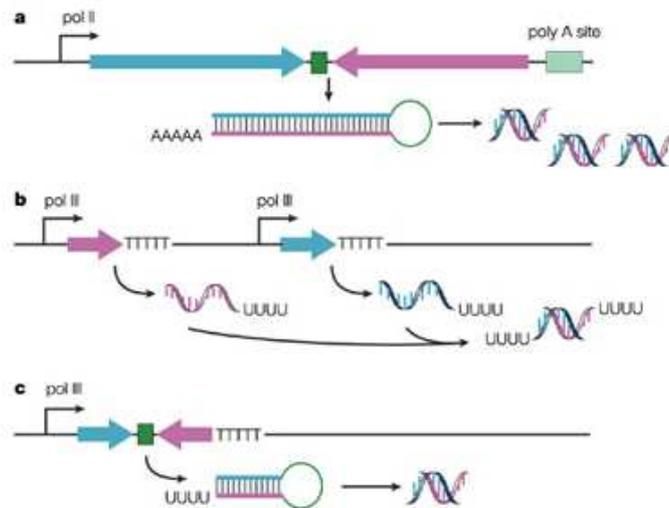


Figure 14 : Production *in vivo* d'ARN interférents

**a. Expression endogène de longs ARN en épingle à cheveux, b. Expression endogène des brins sens et antisens d'un siRNA à l'aide de deux promoteurs, c. Expression endogène de shRNAs. (d'après Dykxhoorn et al.).[36]**

Les shRNAs sont donc de petits ARN simples brins repliés en épingle à cheveux, avec une tige de 19 à 29 nucléotides de long et une boucle de taille variable (4 à 23 nucléotides de long) [36] majoritairement utilisés pour une expression endogène de siRNAs, bien qu'il soit également possible d'introduire des shRNAs synthétiques exogènes. La production *in vivo* de ces petits shRNAs évite une réponse de type interféron que l'on pourrait observer avec la production endogène de longs ARN en épingle à cheveux (Figure 14-a) [36]. Ces shRNAs exprimés dans le noyau sont exportés vers le cytoplasme par l'exportine 5 où ils sont transformés en siRNAs par le complexe enzymatique Dicer puis pris en charge par le complexe RISC pour cliver les ARNm complémentaires. Toutefois, une expression permanente de ces shRNAs peut avoir des effets indésirables non-négligeables soit similaires à ceux observés pour les siRNAs (induction de réponse interféron et production d'interleukines causées par certains motifs dans les séquences [37-39], effets non-spécifiques), soit intrinsèques à leur production endogène (saturation de l'exportine 5, résultant en une dérégulation des miRNAs cellulaires [40], ou toxicité liée au vecteur viral utilisé).

#### **d. Oligonucléotides ciblant l'ARN pré-messager**

Comme nous l'avons vu au paragraphe I.B.1 de ce chapitre, l'épissage de l'ARN pré-messager est particulièrement important dans la régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes. Pour plus de 70% des gènes des cellules humaines [41], cet épissage est un

épissage dit « alternatif » (pour une revue détaillée sur les différents mécanismes d'épissage alternatif, voir Matlin et al.) [42]. Ceci signifie qu'à partir d'un même transcrite d'ARN pré-messager, plusieurs ARNm, et donc plusieurs protéines isoformes peuvent être produits. En effet, l'excision des introns et la jonction des exons peuvent s'effectuer selon différentes combinaisons à l'aide d'un complexe ribonucléoprotéique : le splicéosome. Pour que les exons soient différenciés des introns par ce complexe, il existe plusieurs motifs nucléotidiques présents à la jonction exon-intron, qui jouent le rôle de signaux pour l'épissage. On retrouve, entre autres, des séquences définissant le site d'épissage en 5' et le site d'épissage en 3'. D'autres éléments de séquences, connus sous le nom d'Exonic/Intronic Splicing Silencer (ESS/ISS) ou d'Exonic/Intronic splicing Enhancer (ESE/ISE), permettent respectivement de réprimer ou favoriser l'utilisation d'un site d'épissage. Ils sont donc fortement impliqués dans l'obtention d'un ARNm correct. Or des mutations dans les séquences définissant les sites d'épissage ou ces éléments auxiliaires (ESS/ISS, ESE/ISE) sont responsables de 15% jusqu'à peut être 50% des maladies génétiques [42, 43]. Des oligonucléotides antisens simples brins, présentant des modifications structurelles qui empêchent leur reconnaissance par la RNase H, peuvent diriger l'épissage des ARN pré-messagers dans le noyau en se liant à ces séquences et en bloquant de façon stérique l'accès du splicéosome et autres facteurs d'épissage au brin transcrite.

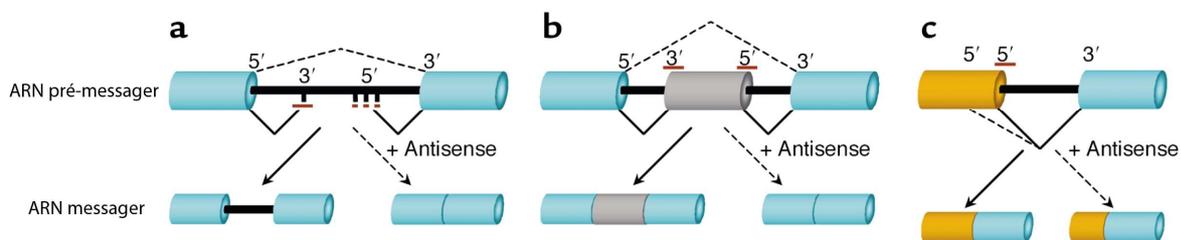


Figure 15 : Stratégies principales de ciblage de l'ARN pré-messager

Il existe trois stratégies principales d'action pour ce type d'oligonucléotides :

1. il est possible de bloquer un épissage aberrant lié à une mutation sur le brin transcrite et restaurer un épissage correct, comme c'est le cas dans la maladie de la  $\beta$ -thalassémie humaine : il s'agit d'une **correction de l'épissage alternatif** (Figure 15-a, d'après Sazani et al.) [44],
2. il est possible de produire une nouvelle protéine qui n'est pas exprimée normalement en supprimant un exon sain ou muté de la séquence finale de l'ARNm : il s'agit de la

stratégie du **saut d'exon**, particulièrement utilisé pour traiter la myopathie de Duchenne (Figure 15-b) [44],

3. il est enfin possible de forcer la sélection d'un site d'épissage 5' pour favoriser la production d'un transcrit donné par rapport à un autre et ainsi stimuler la production d'une protéine isoforme souhaitée (Figure 15-c) [44] : c'est par exemple le cas lorsque l'on veut passer d'une forme anti-apoptotique de la protéine Bcl-xL (membre de la famille des protéines Bcl-2, responsables de la résistance de cellules cancéreuses à la chimiothérapie) vers une forme pro-apoptotique Bcl-xS [45].

La  $\beta$ -thalassémie humaine, évoquée au chapitre 3 pour une correction de l'épissage alternatif, est une maladie génétique qui se caractérise par une déficience en  $\beta$ -globine, une sous unité de l'hémoglobine, aboutissant à la réduction ou à l'absence d'une hémoglobine A adulte. Cette pathologie décroît la capacité des globules rouges à transporter l'oxygène. En conséquence on observe des déformations osseuses résultant de l'hyper activité de la moelle pour compenser les déficits sanguins. Pour les formes les plus sévères de cette pathologie, l'espérance de vie sans traitement ne dépasse pas les 8 ans. La plupart des mutations du gène de la  $\beta$ -globine (se trouvant sur le chromosome 11) affecte l'étape d'épissage et se situe sur l'intron 1 (mutations IVS1-5, IVS1-6, IVS1-110) ou l'intron 2 (mutations IVS2-654, IVS2-705, IVS2-745). Les mutations affectant l'intron 2 crée un site d'épissage aberrant en 5', ce qui a pour conséquence d'activer un site d'épissage cryptique en 3' et la conservation de cette séquence intronique dans les transcrits ARNm (Figure 15-a). Les sites d'épissage cryptiques peuvent être considérés comme des séquences d'ARN qui ressemblent fortement aux véritables signaux d'épissage. Dans le chapitre 3, nous étudierons *in vitro* une correction de l'épissage alternatif à l'aide d'oligonucléotides conjugués ciblant la mutation IVS2-705 de l'intron 2 du gène de la  $\beta$ -globine.

Parmi les essais thérapeutiques en cours visant l'ARN pré-messager, ceux qui créent le plus d'attentes ont recours à la technique du saut d'exon et concernent la dystrophie musculaire de Duchenne. Cette myopathie est une maladie génétique fatale, caractérisée par une dégénérescence progressive et sévère des muscles. Elle est provoquée par des délétions (perte d'un nucléotide) ou autres mutations sur le gène codant pour la synthèse de la dystrophine, une protéine qui permet normalement le bon fonctionnement des muscles. On distingue deux phénotypes selon que les mutations engendrent ou non un décalage du cadre de lecture : respectivement la dystrophie musculaire de Duchenne et la dystrophie musculaire de Becker.

Les patients atteints de la myopathie de Duchenne (provoquées dans 72% par des délétions et décalage du cadre de lecture) [46] ne possèdent pas de dystrophine fonctionnelle : ils deviennent incapables de marcher avant l'âge de 13 ans et ont une espérance de vie inférieure à 30 ans, alors que ceux atteints de la myopathie de Becker possèdent généralement une protéine tronquée mais fonctionnelle : ils conservent leur faculté motrice beaucoup plus longtemps et ont une espérance de vie quasi-normale [47]. D'autre part, certaines fibres de patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne sont révertantes et donc capables de restaurer une dystrophine fonctionnelle par épissage alternatif résultant en un saut d'exon. En se basant sur ces observations, la plupart des essais en cours consiste à mimer ce phénomène naturel en utilisant des oligonucléotides antisens modifiés afin d'enlever un ou plusieurs exons concernés par des mutations (généralement les exons 45 à 55, et plus particulièrement l'exon 51) et restaurer l'expression d'une dystrophine tronquée mais fonctionnelle. Trois essais cliniques sont actuellement en cours avec des oligonucléotides antisens modifiés [46, 48, 49]. D'autres maladies génétiques pourraient être traitées par cette approche, pour une revue détaillée, voir Kole et coll. [44, 50].

### C. Limites à l'utilisation thérapeutique des acides nucléiques

En raison de leur nature hydrophile et anionique, les acides nucléiques sont incapables de traverser la membrane cellulaire, alors que leur site d'action se trouve généralement dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule. La membrane cellulaire est en effet constituée essentiellement de phospholipides, de cholestérol et de protéines membranaires (Figure 16, source : National Institute of Standards and Technology (NIST)).

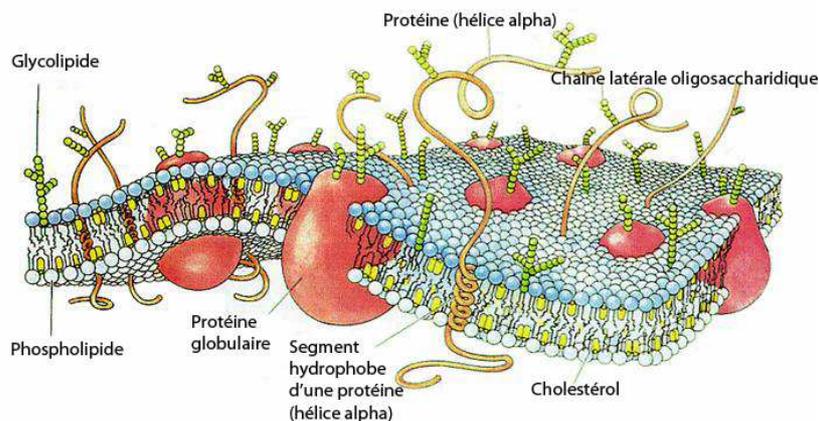


Figure 16 : Composition de la membrane cellulaire

D'autre part, ils sont particulièrement sensibles à la dégradation par des nucléases, en particulier les acides nucléiques ARN. Parmi les stratégies développées pour la délivrance de gènes ou d'oligonucléotides dans les cellules, on retrouve essentiellement deux types de vecteurs : les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques. Ils permettent d'amener les acides nucléiques à leur site d'action tout en les préservant d'une quelconque dégradation. Les vecteurs viraux utilisent les propriétés d'infection des virus pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Les vecteurs synthétiques sont généralement des entités cationiques (lipides, polymères, dendrimères, peptides). Ces derniers interagissent à la fois avec les acides nucléiques anioniques, permettant ainsi la formation de particules, et la membrane cellulaire. En raison de leur taille élevée (généralement  $> 20$  nm et jusqu'à quelques microns), les vecteurs viraux et synthétiques présentent certains inconvénients et avantages. Alors qu'il est possible dans certains cas d'utiliser une application locale pour amener les acides nucléiques à leur site d'action, il faut parfois avoir recours à une administration systémique pour atteindre certains tissus ou organes.

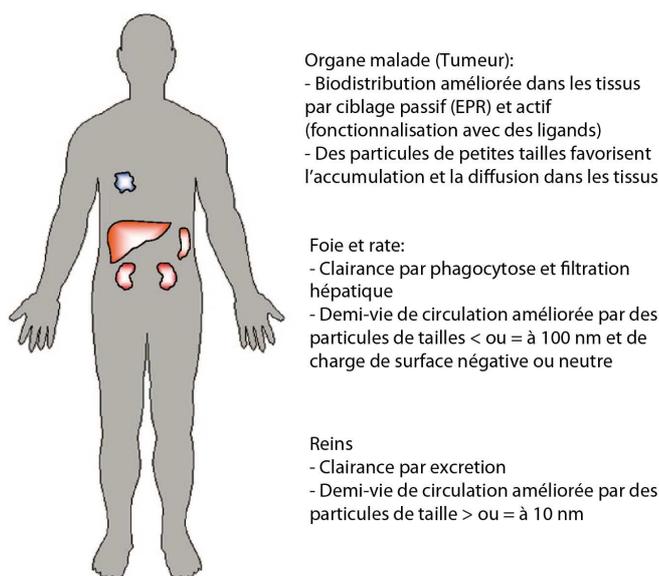


Figure 17 : Organes "filtres" de l'organisme

Or, il existe *in vivo* un certain nombre d'organes « filtres » qui peuvent être responsables de l'élimination des acides nucléiques seuls ou vectorisés lors d'une application par intraveineuse : les reins, la rate et le foie (Figure 17, d'après Alexis et al.) [51], auxquels il faut ajouter les poumons. Les reins excrètent par exemple, les particules de petite taille ( $< 6$  nm, 50 kDa). En ce cas, la présence de vecteurs évite la filtration glomérulaire des oligonucléotides. En contrepartie, les molécules de taille supérieure à 5 nm ne sont pas capables de passer la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins [20]. Le foie, la rate et

certaines tumeurs (effet EPR) laissent passer des molécules jusqu'à 200 nm de diamètre mais celles-ci peuvent ainsi être captées et éliminées [20].

### III. DELIVRANCE DES ACIDES NUCLEIQUES

Comme cela a été évoqué dans le paragraphe précédent, les acides nucléiques nécessitent généralement des vecteurs pour les acheminer vers leur site d'action : les vecteurs viraux ou synthétiques. Toutefois, ils ne permettent pas de s'affranchir de tout problème *in vivo*. Des méthodes alternatives sont donc à l'étude pour améliorer l'entrée cellulaire des acides nucléiques : les méthodes physiques, ou pour augmenter leur stabilité aux nucléases : les modifications chimiques des oligonucléotides. Cette dernière éventualité est apparue avec l'émergence de stratégies de modulation de l'expression d'un gène basées sur l'utilisation d'oligonucléotides. En association avec ces modifications chimiques, un nouveau mode de transfection a émergé : le couplage covalent sur les acides nucléiques de résidus responsables de leur internalisation cellulaire.

#### A. Les vecteurs viraux

Initialement développés pour la thérapie génique, la production de ce type de vecteurs consiste à modifier un virus de façon à ce que le matériel génomique responsable de sa pathogénicité soit éliminé, et qu'il ne conserve que les séquences codant pour la construction de la particule virale et le cycle d'infection. En contrepartie, ce matériel viral est remplacé soit par la cassette d'expression du gène d'intérêt thérapeutique (transgène), soit par des séquences codant pour des oligonucléotides médicamenteux (oligonucléotides antisens, siRNAs) [52-55] : il s'agit d'une production endogène. Les virus obtenus sont alors dits « sécurisés » et l'infection des cellules par ce virus recombinant est appelée transduction. Plusieurs types de vecteurs viraux sont utilisés, dont les principaux sont évoqués brièvement ci-après (Figure 18, d'après Edelstein et al.) [2].

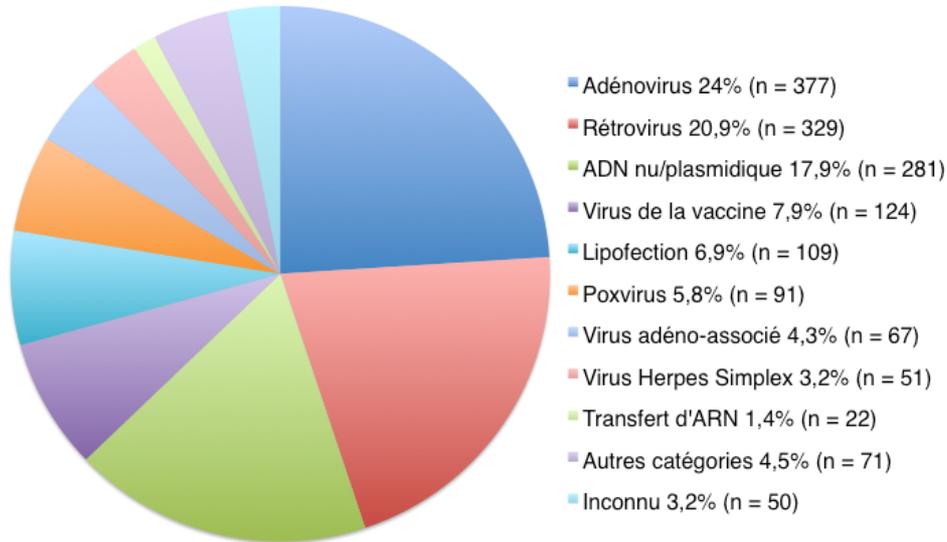


Figure 18 : Vecteurs les plus utilisés en thérapie génique (2009)

## 1. Les rétrovirus

Il s'agit de virus à ARN associés à la transcriptase inverse. Cette enzyme les rend capables de répliquer l'ARN viral en un ADN s'intégrant au génome des cellules hôtes (ex : VIH), transmissible aux cellules filles. En règle générale, ils sont actifs sur des cellules en division exclusivement, ce qui limite leur utilisation. D'autre part, ils sont peu efficaces *in vivo* car ils sont rapidement inactivés par le système immunitaire (système du complément). En revanche, il est possible de les utiliser *ex vivo* : cette technique consiste à prélever et cultiver les cellules d'un patient *in vitro*, de les traiter avec le virus recombinant, puis de les réinjecter au même patient, évitant ainsi le risque de rejet. La limitation la plus forte à l'usage de ce type de vecteur viral provient surtout de problèmes de sécurité : génération de virus recombinants capables de réplication, insertion aléatoire au sein du génome hôte, potentiellement mutagène, voire carcinogène [56]. Parmi les rétrovirus, les lentivirus présentent actuellement le plus d'intérêt. Cette sous-classe a pour particularité, contrairement aux autres rétrovirus, de pénétrer à l'intérieur du noyau des cellules, et sont donc capables de transduction sur la plupart des cellules quiescentes. Les risques de génération de recombinants capables de répliquer ou d'insérer pro-oncogènes [57] semblent réduits par rapport aux autres rétrovirus (pour des revues, voir Woods et al., [58] Park, [57] Wanisch et Yáñez-Muñoz [59]).

## 2. Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus sans enveloppe, dont le génome est constitué d'ADN double brin. Comme les lentivirus, ces vecteurs sont capables de transduction dans les cellules quiescentes ou en division et se révèlent extrêmement efficaces. Contrairement aux autres virus, la propagation de l'information génétique des adénovirus s'effectue hors du noyau des cellules ciblées, de façon extrachromosomale, ce qui amoindrit considérablement le risque d'une intégration délétère au sein du génome hôte. Ceci signifie, en contrepartie, que l'information génétique est moins bien conservée au cours des divisions cellulaires successives. Cette particularité en fait le vecteur le plus adapté pour les thérapies où une expression transitoire du transgène est suffisante, comme dans le cas de traitement de cancers (où ils représentent 25% des essais cliniques) [53, 60, 61]. Toutefois, les adénovirus présentent souvent une hépatotoxicité élevée, nécessitent en outre le développement de nouvelles stratégies de tropisme cellulaire ou tissulaire en raison de leur faible spécificité [62, 63] et ne peuvent être appliqués de façon répétée en raison de leur capacité à activer une réponse immunitaire [64].

## 3. Les virus adéno-associés

Les virus adéno-associés sont des parvovirus à ADN simple brin de tailles réduites (jusqu'à 20-25 nm), qui ne présentent aucune pathogénicité connue pour l'homme. Ce sont des virus défectifs dans la mesure où ils nécessitent l'aide d'un autre virus pour leur réplication (adénovirus ou virus herpès). Ils infectent aussi bien les cellules quiescentes que les cellules en division et s'intègrent de façon localisée sur le chromosome 19 chez l'être humain [65]. La principale limite à leur utilisation en thérapie génique est la faible taille du matériel génomique qu'ils peuvent intégrer (environ 4,5 kb contre 8 kb à 35 kb pour les autres vecteurs viraux). Leur quasi-innocuité censée leur assurer un développement accru a de plus été remise en question lors d'un essai clinique, après le décès d'une patiente souffrant d'arthrite rhumatoïde [66].

#### 4. Autres approches

D'autres virus ont été développés en tant que vecteur des acides nucléiques, mais ne seront pas développés ici, en raison de leur moindre utilisation, par exemple : le virus herpès simplex [67] et les poxvirus (mise au point de vaccins géniques) [68].

#### 5. Avantages et inconvénients des vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont les vecteurs de prédilection en terme d'efficacité de pénétration cellulaire et de persistance du matériel génétique. Ils sont majoritairement utilisés dans les essais cliniques. Toutefois, leur utilisation souffre encore d'un certain nombre de limitations. On retrouve, entre autres, des risques d'immunogénicité (déclenchement d'une réponse immunitaire), des risques d'intégration mutagène du transgène au sein du génome cible, des risques de recombinaison délétère avec le génome hôte ou des souches virales sauvages, des risques découlant d'un mauvais ciblage des tissus (développement d'effets secondaires toxiques ou d'une réponse immunitaire par interaction avec des cellules présentatrice d'antigènes) qui ont pu aboutir sur le décès de patients en phase clinique [56, 62, 66, 69-71]. Outre des problèmes de sécurité, l'utilisation d'agents viraux s'avère souvent relativement difficile à mettre en œuvre et coûteuse. Les vecteurs synthétiques, de production relativement aisée, bien moins onéreux, et vraisemblablement plus sûrs pourraient s'avérer une alternative solide pour les différentes thérapies basées sur les acides nucléiques.

### B. Les vecteurs synthétiques

#### 1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules constituées de bicouches lipidiques concentriques, avec en leur cœur un compartiment aqueux (Figure 19, source Wikipédia). Les lipides utilisés sont constitués d'une tête hydrophile et d'une ou plusieurs queues hydrophobes. Bien qu'il existe des liposomes anioniques ou neutres, ce sont les liposomes cationiques qui sont majoritairement utilisés pour la transfection. Ils sont sujets à de nombreuses études *in vivo*

pour la délivrance d'oligonucléotides, et en particulier de siRNAs, et ont montré des résultats prometteurs chez des primates non humains [72].

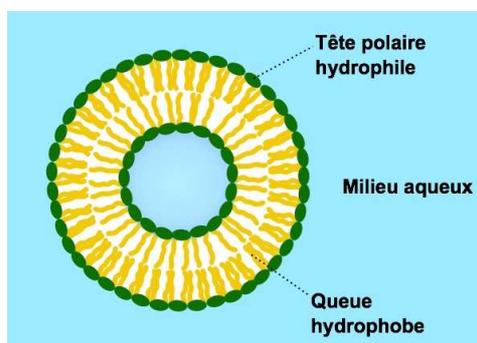


Figure 19 : Schéma d'un liposome

## 2. Les lipides cationiques

Bien que la plupart des lipides cationiques soient capables de former des liposomes, certains s'en différencient par la structure des particules formées en présence d'acides nucléiques. Au lieu d'avoir une formation de vésicules creuses emprisonnant le principe actif, les acides nucléiques se complexent avec les lipides cationiques, pour former des structures appelées lipoplexes. Parmi les lipides cationiques les plus connus pour la transfection d'acides nucléiques, on retrouve le DOTAP, le DOTMA, les lipopolyspermines (exemple : DOSPER ou DOGS) (Figure 20).

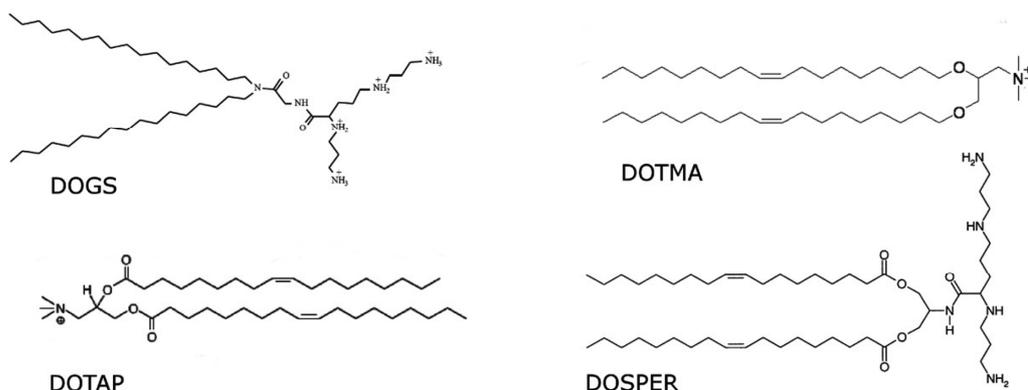


Figure 20 : Lipides cationiques

Comme pour les liposomes cationiques, plusieurs essais cliniques sont en cours : par exemple, le siRNA ALN-VSP développé par la société Alnylam (cf. Tableau 1) est vectorisé à l'aide de lipides cationiques formant des particules stables (SNALP : Stable Nucleic Acid Lipid Particle). Néanmoins, on peut parfois observer certaines réponses immunitaires associées aux lipides cationiques employés, selon leurs compositions (pour une revue détaillée sur les lipides cationiques en tant que vecteurs, consulter Lonez et al.) [73].

### 3. Les polymères cationiques

Les polymères cationiques permettent par interactions électrostatiques de transporter des acides nucléiques de taille plus élevée que dans le cas des vecteurs viraux. Les polymères cationiques les plus connus pour la transfection sont par exemple la polyéthylèneimine (PEI) [74], le chitosane [75], le DEAE dextrane [76], ou la poly-L-Lysine [77].

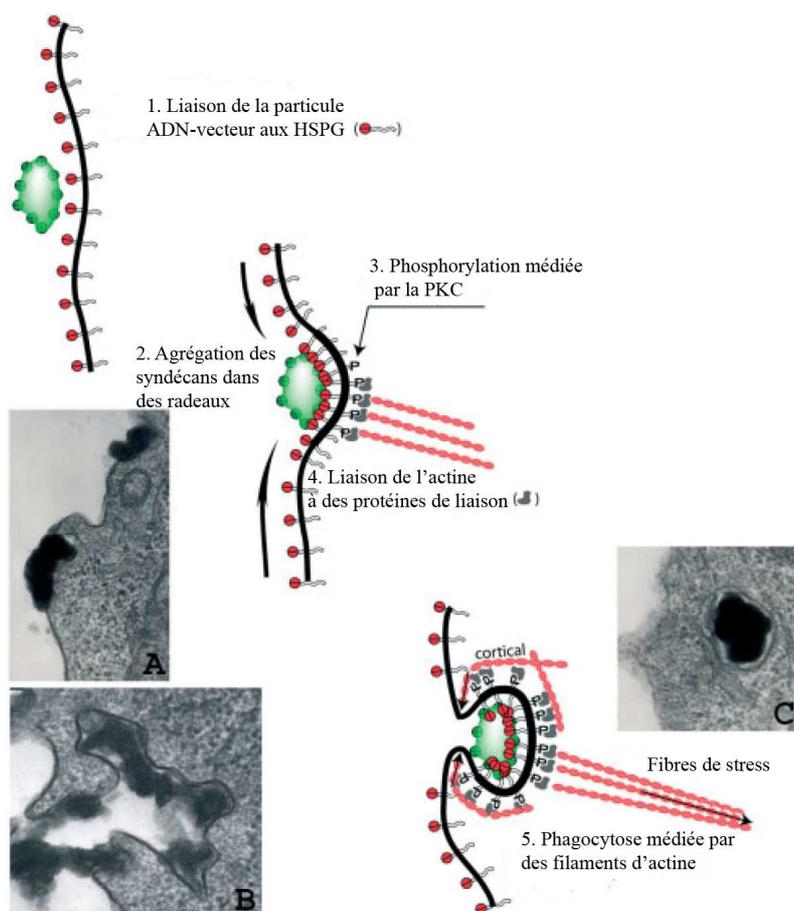


Figure 21 : Internalisation cellulaire médiée par un vecteur synthétique, la PEI

Le mécanisme d'entrée cellulaire postulée pour un de ces vecteurs cationiques, la PEI, est le suivant (Figure 21, d'après Kopatz et al.) [78] : la particule cationique interagit dans un premier temps avec des récepteurs cellulaires de la famille des syndécans, les Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG). L'approche de la particule vers la membrane entraîne la condensation par diffusion des HSPG adjacents autour de la cellule, dans des radeaux riches en cholestérol. Ce phénomène engendre la phosphorylation des domaines intracellulaires des syndécans par la Protéine Kinase C (PKC) et la formation consécutive de fibres d'actine qui se lient à l'aide de protéines de liaison à ces extrémités phosphorylées [78]. Ces fibres d'actines « tirent » ensuite le complexe à l'intérieur de la cellule, entraînant la formation d'un endosome. Naturellement, le matériel génétique devrait par la suite être dégradé par fusion des endosomes avec des lysosomes et acidification du milieu pour favoriser l'activité d'enzymes hydrolases acides. Toutefois, l'utilisation de PEI comme vecteur de transfection permet aux acides nucléiques de s'échapper des endosomes par effet éponge à protons [79], alors que d'autres vecteurs nécessitent un agent endosomolytique. À pH physiologique, tous les atomes d'azote de la PEI ne sont pas protonés. Le pouvoir tampon de la PEI permet l'accumulation de protons dans l'organite, conjuguée à un afflux d'anions  $[Cl^-]$ , ce qui engendre une déstabilisation de la vésicule endosomale par pression osmotique et une libération du polyplexe dans le cytoplasme (Figure 22, d'après Behr) [79].

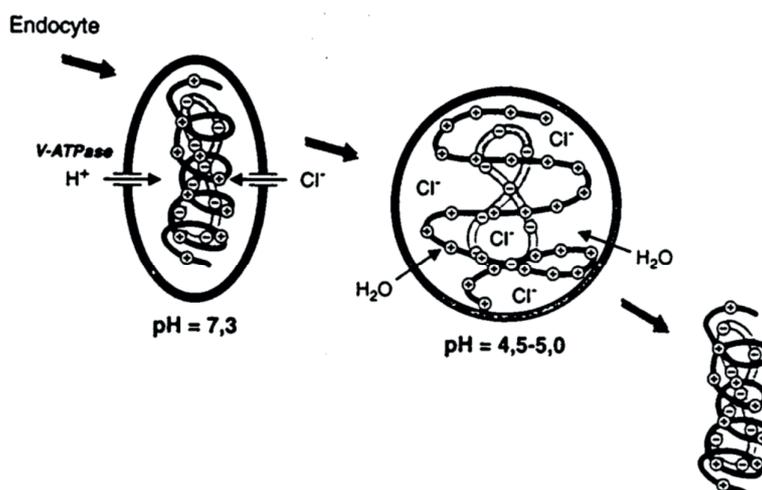


Figure 22 : Mécanisme d'éponge à protons

Sur le modèle de la PEI, beaucoup de vecteurs cationiques permettent l'entrée cellulaire des acides nucléiques par endocytose. La PEI, branchée ou linéaire, s'est révélée comme l'un des vecteurs synthétiques les plus efficaces pour le transport de gènes. Toutefois, son utilisation

avec des oligonucléotides peut nécessiter certaines améliorations [80], comme par exemple sa conjugaison avec des chaînes PEGylées et des motifs peptidiques RGD [81], des folates [82] ou encore sa conjugaison à des acides aminés [83, 84].

#### 4. Les dendrimères

Les dendrimères sont des molécules développées vers la fin des années 1970. Ils sont formés à la manière d'un arbre (d'où leur nom dendrimères : dendron signifie arbre en grec, et meros signifie : partie). Ils comportent une molécule en leur cœur, sur laquelle sont branchées plusieurs fonctions réactives. Sur ces fonctions, il est possible de faire réagir d'autres molécules branchées, afin d'obtenir une structure arborescente. Leur structure particulière les distingue des autres polymères : leur synthèse par étapes graduelles permet d'obtenir des composés de taille bien définie, avec un très faible index de polydispersité. Ils possèdent en outre une très forte densité de fonctions cationiques à leur surface pour la transfection. Il s'agit généralement de groupements amines. Les dendrimères les plus connus pour le transfert d'acides nucléiques sont les dendrimères polyamidoamines (PAMAM, Figure 23).

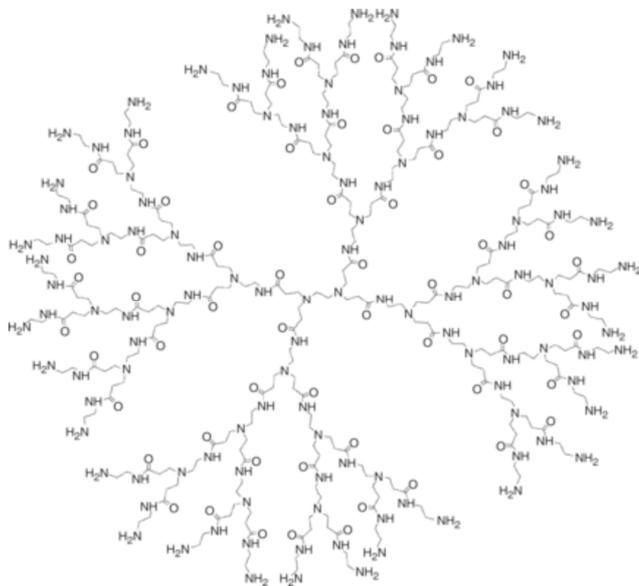


Figure 23 : Structure des dendrimères PAMAM

Les dendrimères sont utilisés pour la délivrance d'oligonucléotides *in vitro* et *in vivo*, mais il ne semble pas y avoir, à ce jour, d'essais cliniques basés sur ces composés [85].

## 5. Les peptides de pénétration cellulaire

Des peptides de pénétration cellulaire (CPP pour Cell-Penetrating Peptides) ont été utilisés pour la transfection d'acides nucléiques. Les séquences en acides aminés de ces CPP proviennent soit d'une protéine naturelle, soit de domaines de plusieurs protéines naturelles ou ne correspondent à aucune protéine en particulier, et ont été synthétisés par des considérations structure-activité. Les différents peptides de pénétration cellulaire, classiquement utilisés aussi bien dans une approche covalente que non-covalente, seront abordés de façon plus détaillée p.50. De façon générale, tous ces peptides présentent la particularité d'avoir une charge globale cationique à pH physiologique. Employés initialement pour convoier des gènes par interactions non-covalentes [86], ils ont été adaptés avec succès au transport d'oligonucléotides [87], tels que les oligonucléotides antisens [88] et les siRNAs [89-91]. Ils ont également été utilisés avec d'autres agents de transfection, comme les dendrimères [92] ou les lipides cationiques, pour améliorer le transport des acides nucléiques vers leur cible [93, 94]. De manière identique à ce qui est observé par conjugaison covalente des peptides sur les acides nucléiques, tous les complexes peptides-acides nucléiques ne permettent pas forcément la délivrance dans le cytoplasme : le matériel génétique peut rester sequestré dans des endosomes (cf. paragraphe III.E.3, p.50) [95].

### C. Les méthodes mécaniques et physiques

Il existe différentes méthodes mécaniques ou physiques pour aider les acides nucléiques à passer les différentes barrières cellulaires. Leur principe général est donné ci-après.

#### 1. La micro-injection

La micro-injection consiste en l'introduction mécanique de matériel génétique dans le cytoplasme ou le noyau d'une cellule, à l'aide d'une micropipette, sous pression hydrostatique. L'injection s'effectue sur une seule cellule, avec une très grande précision et est visualisée par microscope. Elle permet d'apporter les acides nucléiques dans le noyau sans qu'ils ne subissent les dégradations habituelles dans le cytoplasme, ce qui induit un fort niveau d'expression. De nos jours, elle constitue la méthode la plus utilisée pour produire des animaux transgéniques. Toutefois, son application pour la délivrance de gènes *in vivo* est

extrêmement limité, en raison du faible nombre de cellules qui peuvent être microinjectées par expérience [96].

## 2. Le bombardement de particules d'ADN

Les techniques « biolistiques » (contraction de biologique et balistique) [96] ont pour but de bombarder les cellules ciblées avec le matériel génétique à intégrer. La propulsion des acides nucléiques s'effectue soit à l'aide de particules de métaux lourds accélérées par une décharge électrique ou d'hélium (« gene gun » ou « canon à ADN »), soit à l'aide de microgouttelettes de liquide sous haute pression (« jet injection »). Initialement utilisée pour l'expression de transgène chez les plantes [97], les essais sur des cellules de mammifères [98] se sont révélés concluants et ont abouti sur quelques essais cliniques [96, 99]. En raison de la faible pénétration du matériel dans les tissus, ces techniques sont plus adaptées à des applications superficielles telles que la peau [96, 99].

## 3. La méthode hydrodynamique

L'injection hydrodynamique consiste à injecter en quelques secondes par voie intraveineuse un large volume de solution contenant les acides nucléiques d'intérêt vectorisés (volume pratiquement équivalent à celui du sang de l'animal injecté). La pression ainsi engendrée perméabilise les membranes cellulaires et permet l'entrée de matériel génétique de très grosse taille dans les cellules (jusqu'à 135kb), mais provoque entre autres des dysfonctionnements cardiaques [100]. Son usage est donc principalement restreint à la recherche, difficilement transposable à des essais cliniques [99].

## 4. L'électroporation

L'une des méthodes physiques les plus communes de transfert d'acides nucléiques est l'électroporation ou électroperméabilisation. Elle consiste en l'augmentation de la conductivité électrique et de la perméabilité de la cellule membranaire soumise à un champ électrique de forte intensité. Cet effet est transitoire et aboutit à la formation de pores de taille

comprise entre 20 nm et 120 nm, permettant le passage du matériel génétique. Plusieurs essais cliniques en thérapie génique basés sur cette méthode sont actuellement en cours [96, 99].

## 5. La sonoporation

La sonoporation consiste à perméabiliser les membranes nucléaires à l'aide d'ultrasons. Ces fréquences créent un phénomène de cavitation acoustique. Les perturbations mécaniques et l'implosion des bulles générées causeraient alors des ouvertures dans la paroi cellulaire et autoriseraient l'entrée d'acides nucléiques de façon non-invasive [96, 99]. Cette approche récente a déjà été développée pour des applications en thérapie génique *in vitro* et *in vivo* [96, 99].

## 6. L'irradiation laser

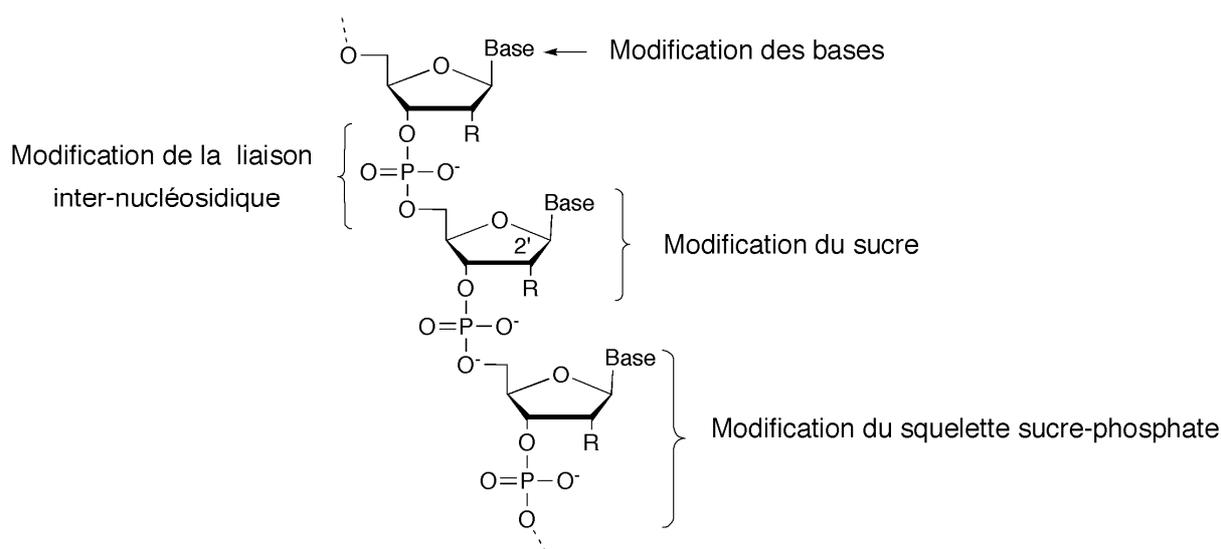
L'utilisation d'une source laser concentrée sur une cellule cible permet de modifier cette dernière au niveau du site d'action du faisceau, par effet thermique. Cette perturbation de la membrane cellulaire serait suffisante pour permettre la transfection de gènes se trouvant à proximité de la cellule. Cette approche, développée dans les années 1980, est très peu utilisée [96].

## 7. La magnétofection

La magnétofection utilise un champ magnétique pour amener des acides nucléiques à des cellules cibles. Pour cela, les acides nucléiques, en présence ou non d'un vecteur sont associés par agrégation à des nanoparticules magnétiques. La présence d'un champ magnétique externe permet de concentrer les particules magnétiques dans le tissu ciblé et améliorerait même l'internalisation cellulaire des acides nucléiques qui leur sont associés par extravasation dans ce tissu cible [99].

## D. Les modifications chimiques

Bien qu'il soit possible d'utiliser des acides nucléiques non modifiés et non vectorisés, tel que de l'ADN plasmidique pour le transfert de gènes, leur efficacité *in vivo* reste limitée [101]. Les modifications chimiques apportées aux oligonucléotides ont généralement pour but d'augmenter leur résistance aux nucléases, tout en conservant leur reconnaissance par les enzymes responsables de leur activité thérapeutique. Elles peuvent également avoir pour conséquence et objectif d'accroître leur affinité pour leur cible, améliorant ainsi leur spécificité et leur efficacité. Toutefois, ces modifications ont parfois pour effet pervers d'abroger ou altérer l'activité thérapeutique. Ces modifications peuvent intervenir à différents niveaux : sur le squelette phosphate, sur le sucre, et en particulier en position 2', sur les nucléobases ou sur l'ensemble sucre-phosphate (Figure 24).



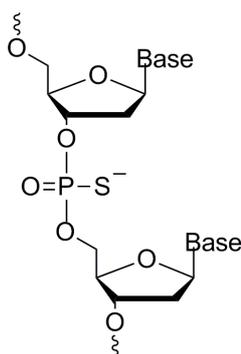
**Figure 24 : Sites de modification des oligonucléotides**

Ces différentes modifications sont évoquées brièvement ci après, agrémentées d'exemples les plus utilisés ou les plus pertinents pour notre exposé (pour une connaissance plus détaillée, voir les revues de Kurreck (2003) [102], Chen et al. (2005) [11], Bell et Micklefield (2009) [103]).

## 1. Modification de la liaison inter-nucléosidique

### a. Les oligonucléotides phosphorothioates

L'ensemble des modifications apportées au squelette vise à augmenter la stabilité aux nucléases. Les oligonucléotides phosphorothioates constituent l'une des modifications les plus majoritairement employées. Ils ont été développés dans les années 1960-1970 par Eckstein et coll. [104, 105] et peuvent être synthétisés de façon automatisée.



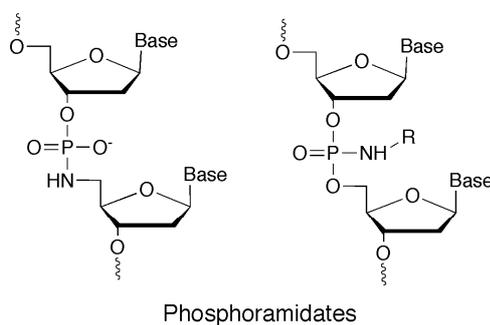
Phosphorothioate (PS)

**Figure 25 : Structure des oligonucléotides phosphorothioates**

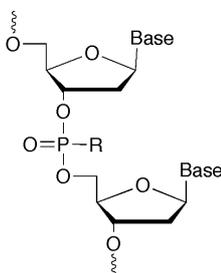
Les oligonucléotides résultants (Figure 25) sont très utilisés pour des stratégies antisens, puisqu'ils conservent leur capacité à recruter la RNase H, ou correction de l'épissage alternatif/saut d'exon, en combinaison avec une modification 2'-OMe sur le sucre. En revanche, ils présentent une moins bonne affinité avec leur séquence cible et peuvent engendrer une réponse immunitaire et une activation du complément [106-108]. Toutefois un médicament antisens phosphorothioate : Vitravene (fomivirsen), pour le traitement de rétinite à cytomégalovirus, à application oculaire directe, a pu voir le jour grâce à ce type de modification. De nombreux essais cliniques sont en cours, basés sur ce squelette phosphorothioate aussi bien pour des applications antisens classiques que pour le saut d'exon [46, 109]. Les résultats obtenus chez l'homme pour l'application saut d'exon montrent une restauration locale de la synthèse de dystrophine de 17% à 35% en moyenne (dans 64% à 97% des fibres musculaires), 28 jours après administration d'une dose de 0,8 mg.kg<sup>-1</sup> d'un oligonucléotide 2'-OMe phosphorothioate ciblant l'exon 51 [46].

### b. Les oligonucléotides phosphoramidates ou phosphonates

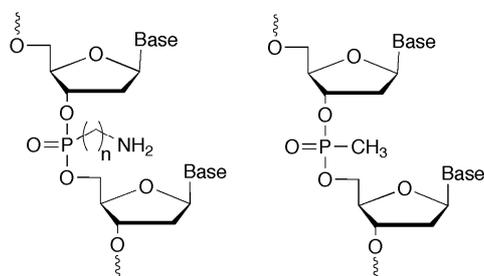
D'autres modifications ou remplacements du lien inter-nucléosidique sont également connus, et consistent à former des oligonucléotides avec un squelette neutre ou cationique. Le but de ces modifications porte essentiellement sur l'amélioration des propriétés physico-chimiques des oligonucléotides correspondants. Parmi ces analogues des acides nucléiques, on trouve notamment les phosphoramidates, développés par Letsinger et coll. [110, 111] et les phosphonates (par ex. : aminoalkyl phosphonates, [112, 113] méthyl phosphonates [114, 115]).



Formule générale des phosphonates:



Exemples de phosphonates:



Aminoalkyl phosphonate

Méthyl phosphonate

**Figure 26 : Modifications du groupement phosphate**

Comme pour les oligonucléotides phosphorothioates, chaque modification peut créer deux diastéréoisomères. Des études menées sur des oligonucléotides phosphoramidates N3'→P5' montrent que leurs propriétés d'hybridation à leur brin de séquence complémentaire sont améliorées par rapport aux acides nucléiques naturels. Dans le cas où le groupement phosphoramidate induit l'apparition d'un phosphore chiral, des travaux sur des oligonucléotides phosphoramidates optiquement purs ont montré que les deux stéréoisomères avaient des effets antagonistes sur leurs propriétés d'hybridation à leur brin de séquence complémentaire. En revanche, lorsqu'il s'agit d'oligonucléotides phosphoramidates

d'anométrie non naturelle  $\alpha$ , leur température de fusion est améliorée par rapport à un oligonucléotide témoin, même lorsqu'ils sont sous forme de mélange de stéréoisomères [116-118]. Enfin, sur le plan thérapeutique, les oligonucléotides phosphoramidates perdent en général leur capacité à recruter la RNase H pour une stratégie antisens, et n'interviennent alors pour ce type d'application que par blocage stérique de l'étape de traduction [119, 120].

### c. Les DNG (ou RNG)

Un dernier exemple de modification de la liaison inter-nucléosidique implique un remplacement complet du groupement phosphate par une fonction guanidine, pouvant s'effectuer sur support solide : il s'agit des DNG [121] (Deoxynucleic guanidine, Figure 27) et RNG (Ribonucleic guanidine) [122].

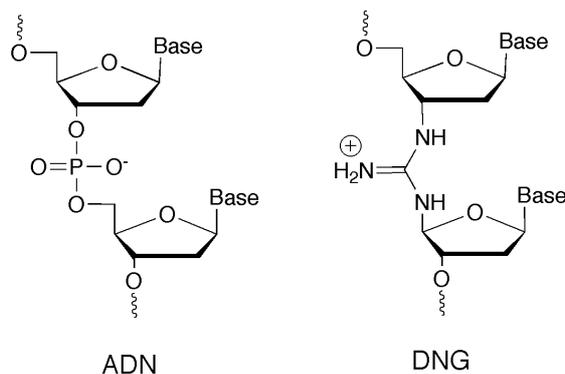


Figure 27 : Comparaison de la structure des DNG et des oligonucléotides ADN

Ce changement de squelette permet d'obtenir des composés résistants aux nucléases [123] et augmente fortement l'affinité de ces analogues avec leur brin cible complémentaire [124]. En raison d'une synthèse toujours en développement, des DNG/RNG essentiellement monotones (présentant un seul type de bases) ont été réalisés, n'excédant pas une dizaine de nucléotides de long [125-128] ou bien des oligonucléotides avec un squelette mixte DNG/DNA [123] ou DNG/PNA [129]. Récemment cependant, un hexamère et un dodécamère de séquences mixtes ciblant l'ADN télomérique humain ont pu être réalisés et leurs propriétés physicochimiques étudiées [130].

## 2. Modification au niveau du sucre

Il existe plusieurs types de modifications possibles au niveau du sucre des oligonucléotides. La plupart d'entre elles touche la position 2'. Quelques exemples parmi les plus usités sont donnés ci-après.

### a. Les LNA (Locked Nucleic Acids)

Les LNA sont des oligonucléotides décrits pour la première fois par le groupe de Wengel [131] possédant un ou plusieurs nucléotides modifiés de sorte que l'atome d'oxygène en position 2' du sucre ribose soit relié au carbone 4' par un « pont » méthylène (Figure 28).

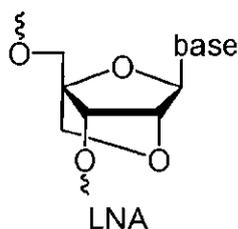


Figure 28 : Structure des LNA

Cette restriction de la conformation permet d'augmenter l'affinité d'un oligonucléotide ADN ou ARN possédant un ou plusieurs résidus LNA pour sa séquence complémentaires (jusqu'à 9,7°C d'augmentation de la température de fusion pour une seule modification LNA introduite, par rapport à un duplex contrôle non modifié) [132]. Cette particularité, conjuguée à leur capacité à discriminer un mésappariement en fait des composés de choix pour des applications diagnostiques telles que la PCR. D'autre part, selon le nombre de nucléotides LNA introduits au sein d'un oligonucléotide, le composé résultant conserve ou non sa capacité à recruter la RNase H. En introduisant seulement quelques résidus LNA, on peut donc non seulement conserver une activité antisens, mais en plus accélérer le clivage de la cible ARN par la RNase H, car les oligonucléotides LNA ont une affinité accrue pour leur séquence complémentaire [133]. Leur stabilité aux exonucléases est également considérablement améliorée : ainsi un oligonucléotide antisens 18-mers possédant 3 modifications LNA à chaque extrémité possède un temps de demi-vie de 15 h contre 1,5 h pour un oligonucléotide antisens sans modification et 10 h pour un oligonucléotide phosphorothioates [133].

### b. Les modifications portant sur la position 2' : 2'-OMe, 2'-MOE et 2'-fluoro

En raison de la présence sur le ribose d'une fonction alcool en position 2', les oligonucléotides ARN sont beaucoup plus sensibles à la dégradation chimique et aux attaques des nucléases que leurs homologues ADN. Pour ces raisons, de nombreuses modifications en position 2' ont été envisagées, essentiellement pour augmenter leur stabilité face aux nucléases. Parmi les plus connues, on retrouve les modifications 2'-O-alkyles : 2'-OMe, 2'-MOE et la modification 2'-fluoro (Figure 29).

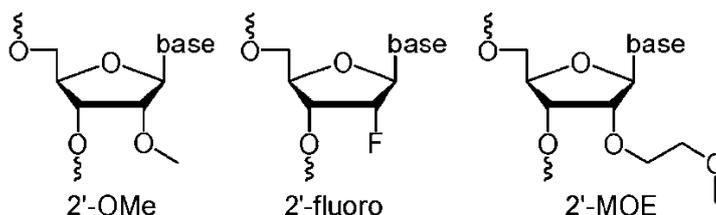


Figure 29 : Modifications en position 2' du sucre

La modification 2'-OMe (2'-O-Méthyle) est présente naturellement sur les ARN ribosomaux des mammifères [80]. Elle permet comme prévu d'augmenter la résistance des oligonucléotides aux nucléases présentes dans le sérum [134]. Elle est très utilisée pour les différentes thérapies basées sur des oligonucléotides. Comme pour toutes les modifications 2'-O-alkyle, elle est employée pour des stratégies antisens indépendantes de la RNase H [80] : elle fait par exemple l'objet d'essais cliniques pour l'application saut d'exon, en conjugaison avec les modifications phosphorothioates [46]. Enfin, elle est également largement employée pour augmenter la stabilité des siRNAs [134-136]. Toutefois, dans ce dernier cas, l'incorporation des modifications 2'-OMe le long du siRNA doit être maîtrisée pour maintenir une activité normale des siRNAs [136, 137]. Un siRNA composé entièrement de nucléotides 2'-OMe par exemple n'est plus capable d'activer le mécanisme d'ARN interférence. Actuellement deux siRNAs candidats médicaments basés sur ces modifications sont en phase clinique II : PF-4523655 (Quark et Pfizer) pour le traitement de l'œdème maculaire diabétique, et QPI-1002 (Quark) pour le traitement d'insuffisance rénale aigüe [138].

La modification 2'-MOE (2'-O-Méthoxyéthyle) est également très employée. Ainsi, on la retrouve chez deux des candidats médicaments antisens de la société ISIS pharmaceuticals : le mipomersen [139] (ISIS 301012, en passe d'être commercialisé), pour la régulation du taux de cholestérol associé aux lipoprotéines LDL (mauvais cholestérol) et OGX-011 (ISIS 112989) en tant qu'anti-cancéreux. Toutefois son utilisation en ARN interférence est un peu

plus limitée : cette modification portée sur le brin antisens des siRNAs semble affecter leur efficacité, il paraît donc plus judicieux de placer ces modifications sur le brin sens [137].

Bien qu'étudiée également pour des oligonucléotides antisens [140], la modification 2'-fluoro est principalement utilisée en ARN interférence, puisque contrairement aux deux précédentes modifications citées, elle peut être placée à n'importe quelle position des siRNAs sans altérer leur efficacité [138]. Comme pour les modifications 2'-OMe et 2'-MOE, la modification 2'-fluoro augmente la stabilité aux nucléases et favorise une conformation C 3' endo du sucre des oligonucléotides, particulièrement adaptée à la formation de duplex dans une conformation A [138]. Toutefois c'est l'alternance entre des modifications 2'-OMe et 2'-fluoro qui semblent donner les siRNAs les plus efficaces (amélioration de l'efficacité d'un facteur 500) [141].

### 3. Modification des nucléobases

Les modifications apportées sur les nucléobases ont plusieurs objectifs : elles permettent d'augmenter la stabilité des duplex correspondants (par exemple addition de spermines sur les bases), d'empêcher la formation de structures secondaires (exemple : G-quadruplexes) et d'améliorer les propriétés biologiques des oligonucléotides correspondants. Parmi les nombreuses modifications envisageables pour augmenter la stabilité des duplex, l'une d'entre elles, réalisée au laboratoire consiste à introduire une polyamine naturelle, la spermine, sur un nucléotide portant une base guanine (Figure 30). Cette introduction s'effectue par la chimie des phosphoramidites [142].

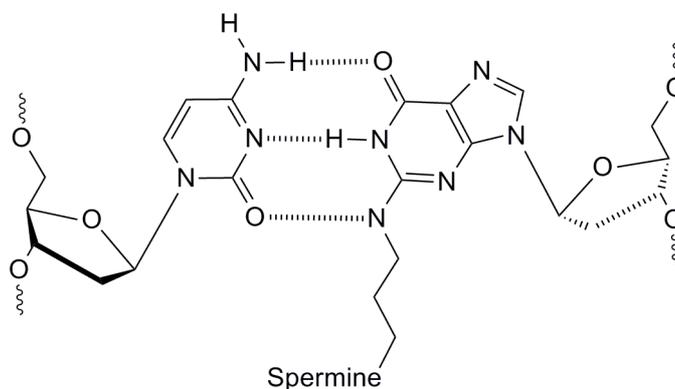


Figure 30 : Guanine modifiée à l'aide d'une spermine

Par cette méthode, jusqu'à 4 modifications spermines ont pu être insérées au sein d'un oligonucléotide 22 mers. L'étude des propriétés des oligonucléotides correspondants montre une stabilisation des duplex modifiés (augmentation des températures de fusion de +3°C par spermine dans des conditions salines 100 mM) [143].

Certaines modifications des bases ont pour but d'empêcher la formation de structures secondaires, que ce soit pour une application antisens ou pour les TFO. Ainsi, certaines séquences d'oligonucléotides antisens présentent des motifs guanines contigus capables de s'arranger en G-quadruplexes, grâce à des interactions de type Hoogsteen. Ces structures pouvant être contraires à l'effet antisens recherché, les remplacer par des bases modifiées 7-déazaguanosines par exemple (Figure 31) a permis d'éviter la formation de ces structures secondaires en abolissant la formation de liaisons de Hoogsteen [102, 144].

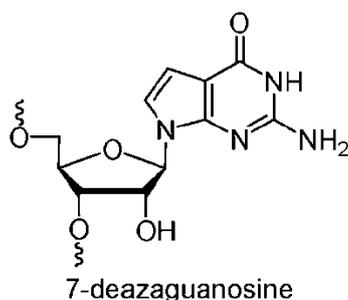


Figure 31 : 7-déazaguanosine

D'autre part, bien qu'il soit possible d'utiliser des TFO présentant des bases pyrimidiques, la formation de structures secondaires, telles que les G-quadruplexes, à concentration physiologique en ion  $K^+$  peut inhiber la formation d'une triple hélice. L'incorporation de bases modifiées telles que les 6-thioguanines ou les 7-déazaxanthines (Figure 32) a permis de réduire ce phénomène [145, 146]. Ces modifications sont donc parfaitement indiquées pour être incorporées dans des TFO.

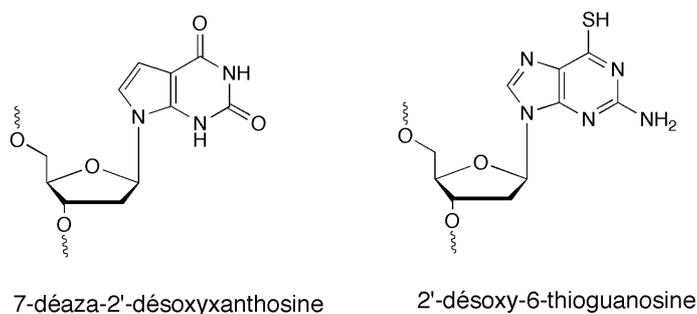
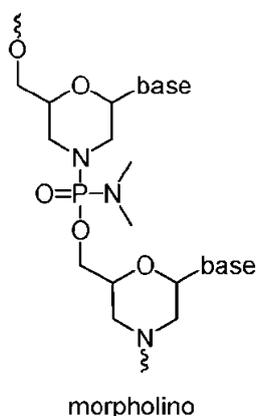


Figure 32 : Structure des bases modifiées 7-déazaxanthine et 6-thioguanine

#### 4. Modification de l'enchaînement sucre-phosphate

##### a. Les oligonucléotides morpholinos phosphorodiamidates (PMO)

Les oligonucléotides morpholinos phosphorodiamidates sont des analogues des acides nucléiques dont l'enchaînement sucre-phosphate est complètement remanié, puisque le sucre ribose est substitué par un cycle morpholine, et que le phosphate est remplacé par un groupement phosphorodiamidate. (Figure 33) Leur synthèse s'effectue sur support solide avec d'excellents rendements de couplage (autour de 99,7%) et des temps de couplages courts ( $T_{1/2}$  d'une ou deux minutes). Contrairement à leurs analogues morpholinos carbamates, également neutres, leur lien phosphorodiamidate leur assure une bonne solubilité en permettant un excellent empilement des bases. Ils s'avèrent en outre particulièrement résistants à une grande variété de nucléases et enzymes et conservent une spécificité remarquable. Ils sembleraient qu'ils pénètrent dans les cellules par endocytose, mais que la majorité voire la totalité des oligonucléotides mis au contact de cellules reste confinée dans les endosomes. Comme pour la plupart des oligonucléotides présentant une structure profondément modifiée, ils agissent en tant qu'agents antisens indépendants de la RNase H [147].



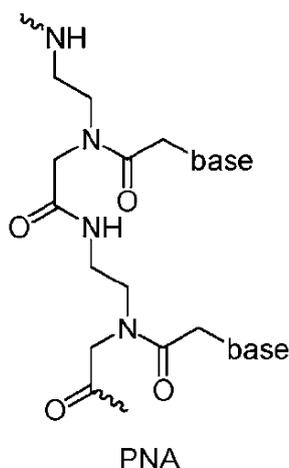
**Figure 33 : Structure des oligonucléotides morpholinos**

Les oligonucléotides morpholinos sont donc principalement utilisés en tant qu'outil antisens pour déterminer la fonction de gènes [148] ou pour des applications en saut d'exon. Des oligonucléotides morpholinos utilisés pour cette dernière stratégie font actuellement l'objet d'un essai clinique en phase III pour le traitement de la myopathie de Duchenne (AVI-4658) [49]. Les résultats montrent une restauration locale de l'expression de la

dystrophine de 22% à 32% en moyenne (pour 44% à 79% des fibres musculaires) en ciblant l'exon 51 pour une dose maximale administrée de  $0,9 \text{ mg.kg}^{-1}$  (4 semaines après injection).

### b. Les acides nucléiques peptidiques (PNA)

Les PNA sont des oligonucléotides dont le squelette naturel a été remplacé par un enchaînement neutre de *N*-(2-aminoéthyl)-glycines reliées entre elles par des liaisons peptidiques. Les bases sont rattachées à l'ossature peptidique par des liaisons méthyl carbonyles (Figure 34).



**Figure 34 : Structure des acides nucléiques peptidiques**

Ces composés ont été développés par le groupe de Peter E. Nielsen [149]. Malgré une similitude structurelle plus forte pour les protéines que pour les acides nucléiques, ils conservent leur capacité à former des liaisons hydrogènes de Watson Crick [150] et sont très résistants aux dégradations par les nucléases et par les protéases [148]. La neutralité de leur squelette leur assure en outre une plus forte interaction avec leur séquence complémentaire, par absence de répulsion électrostatique entre les deux brins : leur  $T_m$  est augmentée d'environ  $1,5^\circ\text{C}$  par paire de bases par rapport à un duplex normal [150]. Ils présenteraient de plus une spécificité (capacité à discriminer une séquence parfaitement complémentaire de séquences comprenant un ou plusieurs mésappariements) égale voire supérieure aux duplex ADN/ADN pour de courtes séquences ( $\leq 12$  mers) [151]. En revanche, lorsque la séquence devient plus longue, l'augmentation de l'affinité des PNA pour leur cible va à l'encontre de leur spécificité [152]. D'autre part, les PNA seuls ne sont pas capables de passer la membrane cellulaire, ni de recruter la RNase H. Pour cette dernière raison, ils ne sont donc pas adaptés à une application antisens classique. C'est pourquoi ils sont principalement employés pour une

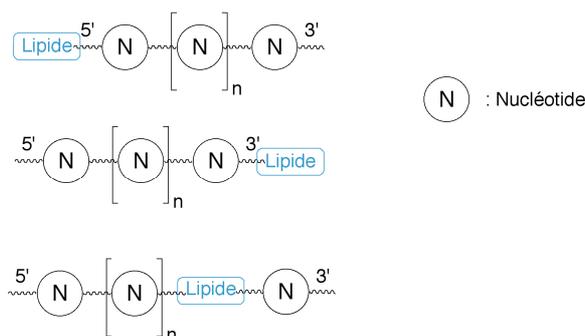
stratégie de correction de l'épissage alternatif ou de saut d'exon, indépendante de cette enzyme. Dans cette optique, ils ont été utilisés avec succès *in vitro* comme *in vivo* [153-155]. Cependant, les PNA seuls se sont avérés inactifs *in vivo* [154] et leur conjugaison à des résidus lysines ou des peptides de pénétration cellulaire (CPP, cf. p.50) est nécessaire pour leur efficacité [154, 155]. Cette conjugaison s'avère possible grâce à leur squelette peptidique, qui permet de coupler aussi bien de petites molécules que des peptides.

## E. Les oligonucléotides conjugués

Il existe un certain nombre de molécules qui peuvent être conjuguées aux oligonucléotides, comme par exemple des fluorophores, des complexes métalliques ou des nanoparticules. Nous nous attacherons dans cette partie à ne décrire que la conjugaison de blocs permettant une amélioration de la biodisponibilité, de la reconnaissance et/ou de l'internalisation cellulaire des oligonucléotides résultants. Les oligonucléotides conjugués peuvent avoir un squelette naturel ou modifié. La conjugaison covalente présente un avantage non-négligeable par rapport aux vecteurs synthétiques ou viraux : elle permet un meilleur contrôle de la taille (par ailleurs plus proche des principes actifs « classiques ») et de la composition finale des produits obtenus, et paraît donc mieux adaptée à un développement pharmaceutique. Les oligonucléotides conjugués, mieux caractérisés, semblent ainsi plus adaptés à des contrôles qualitatifs.

### 1. Les oligonucléotides conjugués à des parties lipidiques

La membrane cellulaire est formée d'une bicouche de phospholipides dans laquelle s'intercale, entre autres, des molécules de cholestérol. Il semble donc assez évident de modifier la nature très hydrophile des oligonucléotides en leur ajoutant des parties hydrophobes pour augmenter l'affinité des acides nucléiques pour la membrane cellulaire et faciliter ainsi leur internalisation. Bien que les modifications lipidiques puissent être introduites à n'importe quel endroit de la séquence, (Figure 35) elles sont préférentiellement conjuguées aux extrémités 3' ou 5' de l'oligonucléotide.



**Figure 35 : Conjugaisons possibles des parties lipidiques**

Cette conjugaison à des parties lipidiques permet de façon générale d'améliorer l'internalisation cellulaire et l'efficacité biologique *in vitro* et *in vivo* (antisens, TFO, siRNA, miRNA) des oligonucléotides correspondants par rapport aux mêmes oligonucléotides non conjugués [156-163]. De façon peu surprenante, la conjugaison à des parties lipidiques renforce également la résistance des acides nucléiques aux nucléases [164]. Dans la majorité des cas, le lipide conjugué est un cholestérol. Ce composé permet ainsi aux oligonucléotides amphiphiles d'interagir avec les lipoprotéines de basse densité (LDL) et donc avec les récepteurs cellulaires des lipoprotéines (LDL) et favorise ainsi leur entrée cellulaire [165]. Les oligonucléotides résultants sont majoritairement pris en charge par les cellules du foie.

## 2. Les oligonucléotides conjugués à des carbohydrates

Les saccharides ou oligosaccharides ont des implications très variées dans les processus biologiques (pour une revue détaillée, voir Varki) [166]. Liés à des protéines ou à des lipides, ils semblent jouer un rôle essentiel dans la reconnaissance cellulaire et présentent de ce fait un grand intérêt pour des applications thérapeutiques [167]. Par exemple, différentes protéines membranaires (lectines), génèrent l'endocytose de molécules liées à un ligand glycosylé. Ces lectines reconnaissent le plus souvent un « agrégat » de motifs carbohydrates précis, plutôt qu'un motif isolé. Des lectines intracellulaires permettent également de diriger les glycoconjugués vers le cytosol ou le noyau. Conjuguer des saccharides à des oligonucléotides semble donc un moyen intéressant d'adresser les composés correspondants à un type cellulaire particulier et augmenter leur stabilité à la dégradation par les nucléases [168]. Toutefois la majorité des publications sur le sujet rapporte essentiellement la synthèse de tels composés (pour une revue, voir Zatsepin et Oretskaya) [169] et très peu d'applications biologiques sont décrites. Certains travaux témoignent néanmoins de l'utilisation d'un

hexamère glycoconjugué pour une activité anti-VIH [170], ou d'une internalisation spécifique des oligonucléotides glycoconjugués en vue d'applications antisens [171-173].

Une application très intéressante de ces glycoconjugués consiste en la réalisation de biopuces [174, 175]. Des oligonucléotides conjugués à quelques résidus saccharidiques (fucose, galactose, mannose) [176-178] jusqu'à des « dendrimères » contenant 16 galactoses [179] ont ainsi été récemment réalisés en combinant la chimie de phosphoramidites et la chimie « click » (couplage de Huisgen). Ces oligonucléotides conjugués à des fucoses et galactoses ont été utilisés de façon fructueuse pour reconnaître des lectines en solution, puis les complexes correspondants ont été immobilisés sur une puce possédant des séquences complémentaires à leur partie nucléotidique [174]. D'autre part, la synthèse des « dendrimères » carbohydratés [179] devrait permettre la réalisation de puces pour l'identification d'inhibiteurs de la lectine PA-IL de *Pseudomonas Aeruginosa*, qui reconnaît particulièrement les motifs galactoses [180].

### 3. Les oligonucléotides conjugués à des CPP

L'idée d'utiliser des peptides de pénétration cellulaire pour l'internalisation d'acides nucléiques vient de l'observation que la protéine *Drosophila Antennapedia* [181] ou la protéine Tat du VIH [182, 183] sont capables de pénétrer par elles-mêmes dans les cellules. Les peptides les plus couramment utilisés pour conjugaison covalente sur les oligonucléotides ont donc une origine naturelle, tels que le peptide Tat 48-60, dérivé du gène du transactivateur de transcription du VIH [184] et le peptide pénétratine, provenant de la protéine *Drosophila Antennapedia* [184]. Comme évoqué précédemment p.35, des peptides chimériques, provenant de différents domaines protéiques associés, tels que le transportan [185], peuvent également être utilisés. Ces peptides de pénétration cellulaire sont généralement cationiques à pH physiologique, riches en arginines ou lysines. Une étude structure-activité ayant montré l'importance des résidus guanidines dans le peptide Tat 48-60, des peptides purement constitués d'arginine sont aussi employés [186].

Le mécanisme d'internalisation de ces peptides cationiques, hydrophiles, est sujet à controverse. Alors qu'initialement un mécanisme de translocation membranaire était évoqué, il semblerait à présent que les CPP, en particulier lorsqu'ils transportent des biomolécules, soient pris en charge par endocytose [187, 188]. Il est possible également que plusieurs mécanismes de transfection se déroulent simultanément [189]. Dans la mesure où les acides

nucléiques ne sont plus protégés des attaques des nucléases par un vecteur particulière, la plupart des CPP est conjuguée à des oligonucléotides modifiés tels que des oligonucléotides PMO, PNA ou 2'-OMe phosphorothioates. En raison de ces altérations structurelles importantes, ils trouvent majoritairement des applications en correction de l'épissage alternatif ou en saut d'exon [155, 190-192], où les oligonucléotides agissent exclusivement par blocage stérique et ne nécessitent pas une reconnaissance enzymatique. Toutefois ces composés ont également été testés avec succès pour des applications en ARN interférence [193-196]. Une des principales limites à l'efficacité des oligonucléotides conjugués à des peptides de pénétration cellulaire provient du fait que tous ne leur permettent pas de s'échapper des endosomes [197]. Dans ce cas, seule une infime partie du matériel génétique se retrouve libéré dans le cytoplasme, alors que le reste est séquestré dans les vésicules d'endocytose. Si l'ajout d'agents endosomolytiques permet de corriger ce problème, ceux-ci présentent souvent une trop forte toxicité *in vivo* [198].

## IV. CONTEXTE ET OBJECTIF DE LA THESE

### A. Contexte

Comme nous l'avons vu, ces dernières années, de nouvelles thérapies basées non plus sur des gènes, mais sur des oligonucléotides ont émergé. Bien que les vecteurs synthétiques initialement développés pour la thérapie génique puissent être adaptés au transport de ces molécules, la différence de taille entre gène et oligonucléotide demande souvent leur optimisation. Tout en continuant la recherche sur ces vecteurs particuliers, les efforts du laboratoire se sont tournés vers un nouveau moyen d'internalisation des acides nucléiques : la conjugaison covalente sur un oligonucléotide de résidus responsables de son internalisation cellulaire. Cette stratégie est devenue envisageable avec la réduction de taille du « principe actif » du gène vers l'oligonucléotide. Le passage d'un vecteur particulière à une simple molécule conjuguée permet de s'affranchir d'un certain nombre d'inconvénients observés avec la première classe d'agents de transfection synthétiques. En effet, en raison de leur taille et de leur charge, ces derniers sont souvent confrontés à des problèmes d'instabilité colloïdale, d'agrégation sur des protéines sériques ou des composants de la matrice extracellulaire, d'opsonisation et phagocytose [51], et de mauvaise diffusion dans les

tissus [20]. En observant les différents vecteurs synthétiques développés, on s'aperçoit que ceux-ci présentent en général une charge globale positive, qui leur permet d'interagir à la fois avec les acides nucléiques et la membrane cellulaire. Cependant pour les polymères cationiques présentant une charge cationique nette, comme la poly-L-lysine, le matériel génétique reste séquestré dans les endosomes. En revanche, les polymères exerçant un pouvoir tampon, comme la PEI, permette la rupture des endosomes. En se basant sur ces observations, il paraît donc logique de greffer sur les acides nucléiques une polyamine naturelle, la spermine. Le choix de cette polyamine n'est pas anodin : elle est présente à une concentration de l'ordre du millimolaire dans les cellules, possède quatre amines protonables à pH physiologique ( $pK_a = 10,8; 10,0; 8,9$  et  $8,0$  à  $25^\circ\text{C}$ , force ionique 100 mM) et est connue pour se lier à l'ADN indépendamment de sa séquence [199]. Un étude menée au laboratoire a montré que les ammoniums de la spermine sont capables de former deux liaisons hydrogènes au niveau du petit sillon de l'ADN-B [200]. De plus, la vitesse d'association de la spermine à l'ADN lui permettrait de se déplacer en « rampant » le long du petit sillon [201]. Le couplage répétitif de cette entité à l'extrémité 3' ou 5' d'un oligonucléotide permet d'obtenir des composés de charge globale négative, neutre ou positive. (Figure 36). Ces couplages s'effectuent efficacement, avec des rendements  $\geq 95\%$ , grâce à la chimie des phosphoramidites. Les conjugués obtenus présentent un grand intérêt pour des applications diagnostiques. Une première étude, amorcée par Pons et al. et complétée par Noir et al. montre que la présence de spermines permet de diminuer les répulsions électrostatiques entre les phosphates et ainsi améliorer la stabilité des duplex correspondants. D'autre part, il devient possible de moduler les températures de fusion et donc l'hybridation d'un oligonucléotide conjugué à sa cible, en ajustant le nombre de spermines qui lui sont couplées. Ceci présente un intérêt particulier pour des applications en PCR (cf p. 13), où il est important de maîtriser la température de fusion des amorces nucléotidiques. Cette approche a donc été testée par Moreau et al [202]. Non seulement, la présence de spermines sur les amorces n'altère pas leur prise en charge par les enzymes polymérase de la PCR, mais les oligonucléotides conjugués (appelés ZNA) restent spécifiques et permettent la détection de cible génomique présente en faible concentration, et s'avèrent ainsi parfaitement adaptés pour un usage en PCR multiplex.



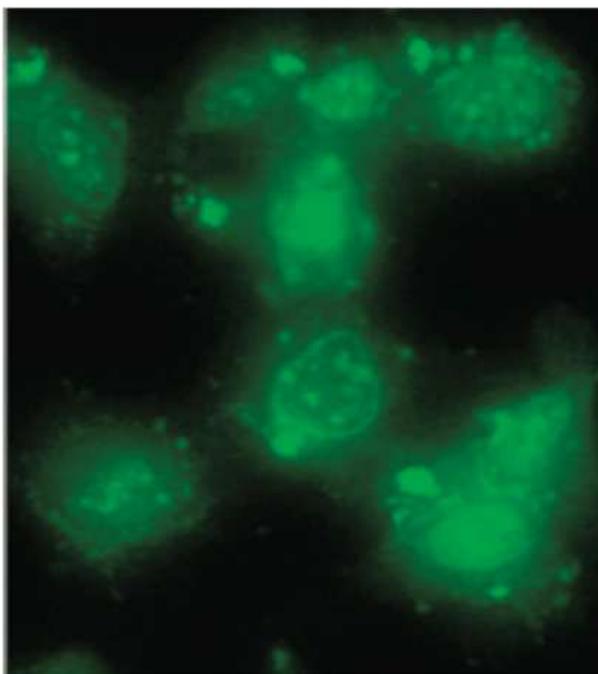


Figure 37 : Internalisation cellulaire d'un oligonucléotide ADN cationique  $S_{18}[N]_{19}$  fluorescent

## B. Objectif de la thèse

Face au réel intérêt présenté par ces composés, trois axes de recherche ont été développés au cours de ma thèse. Le premier consiste à améliorer les propriétés des oligonucléotides conjugués en modifiant la nature de la queue polyamine. Pour cela, le lien spermine inter-phosphate, de masse molaire élevé et anionique peut être remplacé par une liaison de masse molaire moins importante et chargée positivement. Cette modification de la chaîne polyaminée nécessite un remaniement complet de la chimie de couplage (phosphoramidite) utilisée jusqu'à présent. Nous avons donc testé l'oligomérisation de spermines par formation d'une liaison guanidine. Les propriétés physico-chimiques de ces nouveaux composés ont été ensuite évaluées, comparativement aux oligonucléotides conjugués obtenus par la chimie des phosphoramidites.

Le deuxième axe de recherche de ma thèse a consisté à synthétiser des oligonucléotides conjugués de première génération, modifiés pour une application thérapeutique : la correction de l'épissage alternatif. De façon classique, le squelette des différents oligonucléotides antisens utilisés pour cette étude a été transformé de manière à posséder des liens inter-nucléosidiques phosphorothioates et des sucres 2'-OMe. Les composés correspondants ont été conjugués à un nombre variable de spermines. L'influence de ce nombre de spermines

conjuguées, l'efficacité en fonction de la concentration et du temps et la spécificité de ces oligonucléotides cationiques ont ensuite été testées en biologie cellulaire.

Enfin, le dernier axe de recherche de ma thèse repose sur l'étude *in vitro* de siRNAs cationiques en vue d'une application *in vivo*. Comme nous l'avons écrit précédemment, les grosses particules ne diffusent pas bien dans les tissus, d'où l'intérêt d'utiliser *in vivo*, pour une application systémique, des molécules isolées, au lieu de particules. Toutefois, des molécules cationiques d'une taille aussi petites sont généralement excrétées par les reins par filtration glomérulaire (sélectivité de taille et de charge). D'autre part, les siRNAs cationiques auto-transfectants ne sont plus protégés de l'activité des nucléases par aucun vecteur. Ainsi, afin d'augmenter la résistance aux nucléases de nos oligonucléotides ainsi que leur biodisponibilité, il nous a semblé judicieux de les pré-assembler avec une protéine sérique : l'albumine. Les complexes siRNAs-albumine ainsi formés pourraient alors être utilisés *in vivo* pour une injection par intraveineuse. Dans le dessein de favoriser l'interaction entre l'albumine et le siRNA cationique, trois analogues ont ainsi été synthétisés, présentant tous un groupement lipidique. Cette partie lipidique doit servir « d'ancre moléculaire » pour « accrocher » le siRNA à l'albumine. Après synthèse de ces trois siRNAs cationiques lipophiles, ces composés ont été caractérisés puis étudiés *in vitro* afin d'évaluer leur potentiel pour une future application *in vivo*.



# Chapitre 2 : Synthèse d'oligonucléotides conjugués à des guanidinospermines



## I. INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la première génération d'oligonucléotides conjugués à des polyamines est obtenue par couplage répétitif d'une polyamine naturelle, la spermine, par la chimie des phosphoramidites [204]. Cette chimie, très utilisée dans la synthèse des oligonucléotides, permet usuellement de coupler les nucléotides entre eux avec des rendements quasi-quantitatifs en 15-20 secondes et aboutit à la création d'un groupement phosphate. Un synthon phosphoramidite spermine a donc été synthétisé (Figure 38).

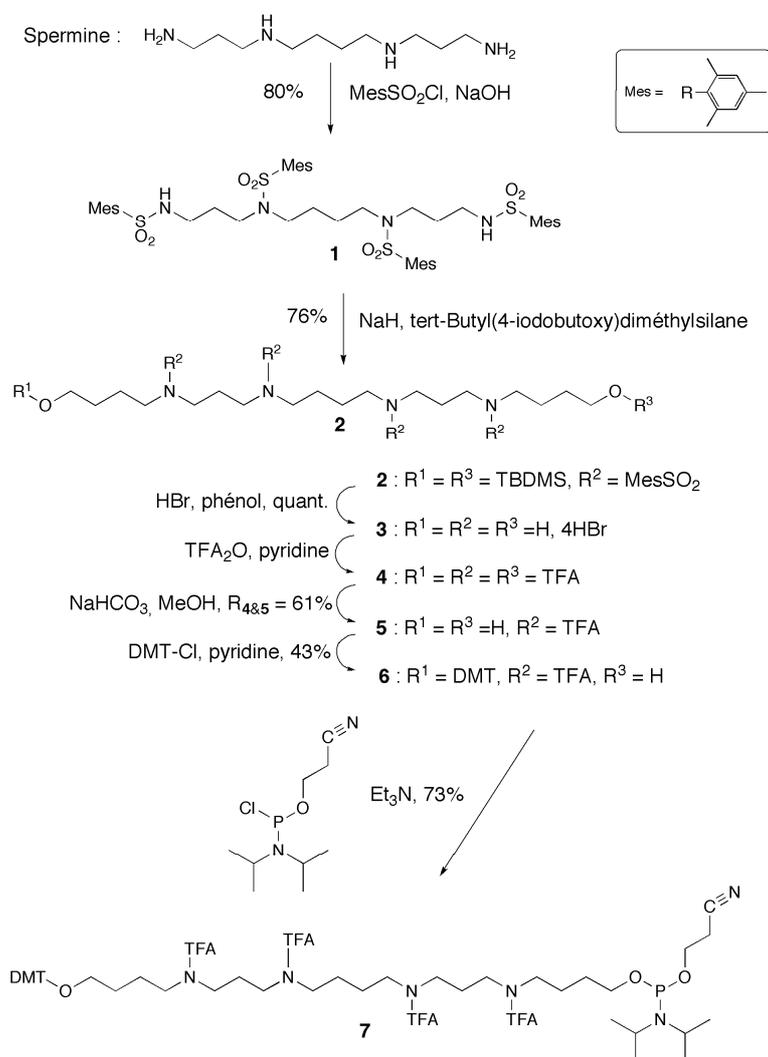
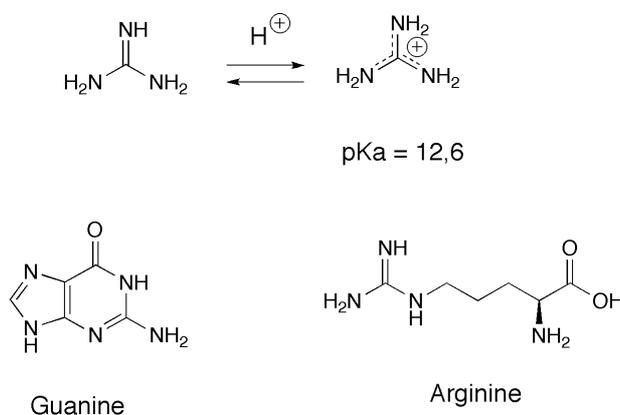


Figure 38 : Synthèse du phosphoramidite spermine

Grâce à ce synthon, jusqu'à une quarantaine d'entités spermines peuvent être conjuguées de façon automatisée à l'extrémité 5' ou 3' d'un oligonucléotide, avec des rendements de

couplage moyen  $\geq 95\%$  et les oligonucléotides conjugués résultants présentent des propriétés particulièrement intéressantes (cf. chapitre 1, p.51). Afin d'améliorer encore ces caractéristiques, plusieurs changements structuraux sont envisageables et font l'objet de ce chapitre de thèse. Tout d'abord, le groupement phosphate inter-spermine va à l'encontre du but recherché : il est « lourd », chargé négativement et clivable en conditions basiques fortes, ce qui nécessite l'utilisation de nucléotides phosphoramidites avec des protections « ultramild ». Or afin d'optimiser la transfection des oligonucléotides, le ratio masse/charge doit être le plus petit possible. D'autre part, le synthon spermine a été bis-alkylé (produit **2**, Figure 38) pour introduire les fonctions phosphoramidite et alcool. À chaque couplage, 8 carbones sont introduits en plus de la spermine, augmentent la masse molaire de la structure et n'apportent pas de charges cationiques. Afin d'abaisser la masse molaire globale de nos conjugués oligonucléotides, l'idée initiale était non seulement de supprimer ce lien inter-spermine, mais surtout de le remplacer par une liaison de plus faible masse molaire, chargée positivement. Pour cela, l'utilisation d'une liaison guanidine semble parfaitement indiquée (Figure 39).



**Figure 39 : Le groupement guanidine**

En effet, la guanidine libre, dont la charge est délocalisée par effet de mésomérie, présente un pKa de 12,6 en conditions physiologiques, ce qui est supérieur aux pKa des différentes amines de la spermine. Le groupement guanidine est naturellement présent sous forme cyclique dans une base azotée de l'ADN, la guanine ou sous forme guanidinium dans un acide aminé, l'arginine. Cette fonction est particulièrement intéressante pour sa capacité à former des liaisons hydrogènes et présente de ce fait des propriétés importantes de reconnaissance moléculaire et de catalyse [205]. Son insertion entre les unités spermines devrait avoir pour

effet d'augmenter la charge cationique de la queue polyaminée, tout en diminuant la masse du lien inter-spermine (Figure 40).

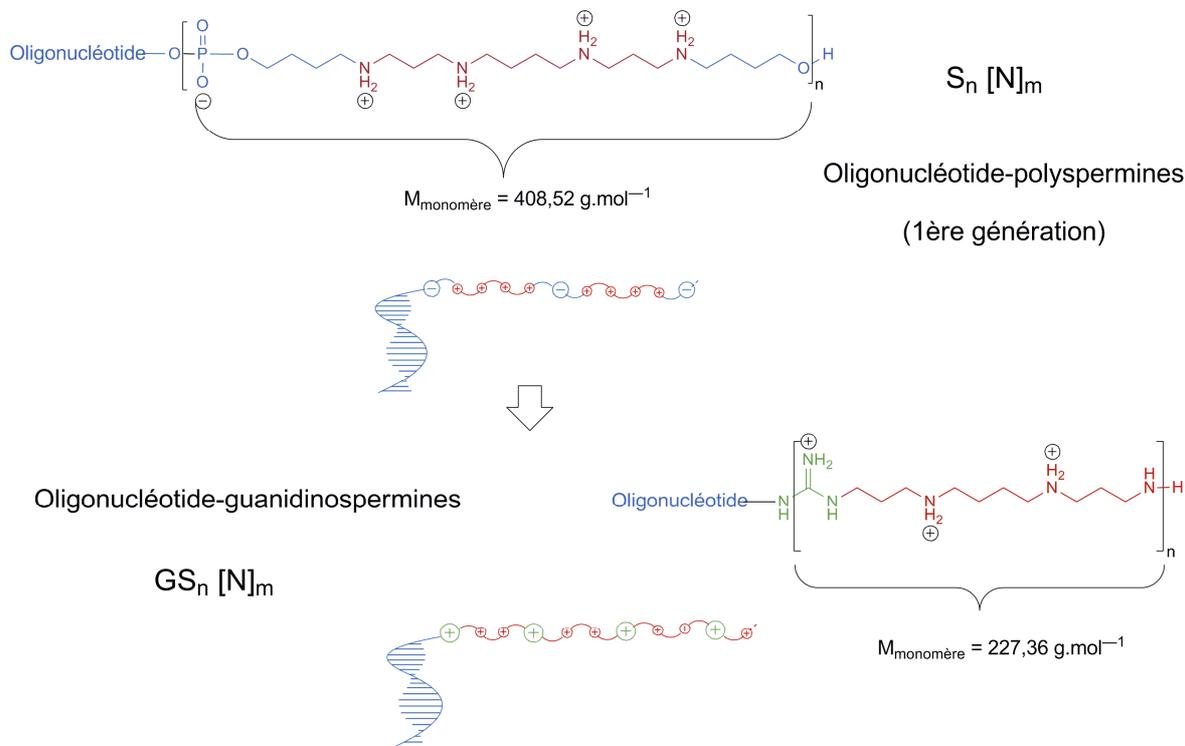


Figure 40 : Structure de la nouvelle génération d'oligonucléotides conjugués

Les oligonucléotides-polyspermines résultants seront par la suite appelés oligonucléotides guanidinospermines. À nombre de spermines équivalents, on s'attend à ce qu'ils aient une masse molaire et un ratio charge cationique/masse moins importants que les oligonucléotides polyspermines développés jusqu'à présent. Ceci devrait théoriquement améliorer à la fois l'internalisation cellulaire des oligonucléotides conjugués, ainsi que leur affinité pour leur séquence complémentaire.

**L'oligomérisation de spermines par un lien guanidine requiert une chimie de couplage très différente de la chimie des phosphoramidites employée précédemment.** Plusieurs stratégies de synthèse permettent d'introduire une fonction guanidine [206-208]. La façon la plus simple et courante d'obtenir une oligomérisation de fonctions guanidines sur support solide consiste en la réaction entre une fonction amine et une fonction thiourée ou isothiourée, en présence d'un activateur [207-212]. Dans notre cas, la fonction thiourée sera portée par le nouveau synthon spermine, alors que le support solide arborera la fonction amine.

Afin d'oligomériser des spermines par liaisons guanidines, nous avons donc réalisé un synthon présentant d'une part, la fonction réactive thiourée, d'autre part, un groupement

protecteur dosable en UV-visible par clivage. En effet, comme la réaction de couplage s'effectue sur support solide, il n'est pas possible de suivre l'évolution de la réaction. La présence de ce groupement protecteur dosable permet donc d'évaluer le rendement du couplage.

La validité de ce nouveau synthon spermine, ainsi que son rendement de couplage sur support solide ont ensuite été testés. Cette molécule a dans un premier temps été couplée en 5' d'un oligonucléotide décamère ADN sur lequel a été introduit une fonction amine. Par la suite, les guanidospermines ont d'abord été oligomérisées en position 3' sur des supports modifiés, avant synthèse de l'oligonucléotide décamère ADN.

## II. SYNTHÈSE DU SYNTHON SPERMINE

### A. Différenciation des amines primaires/secondaires de la spermine

Les composés Fmoc isothiocyanate et chlorure de 4-monométhoxytrityle nécessaires respectivement pour l'introduction de la fonction thiourée et du groupement dosable en UV sont très réactifs. En conséquence, on différencie dans un premier temps les amines primaires des amines secondaires de la spermine à l'aide de groupements protecteurs orthogonaux. Les groupements protecteurs présents sur la molécule finale devront par ailleurs être facilement déprotégés dans des conditions compatibles avec la présence d'oligonucléotides.

La spermine a donc d'abord été tétratrifluoroacétylée à l'aide d'anhydride trifluoroacétique en présence d'un activateur, la DMAP pour donner le composé tétraprotégé **1** (Figure 41).

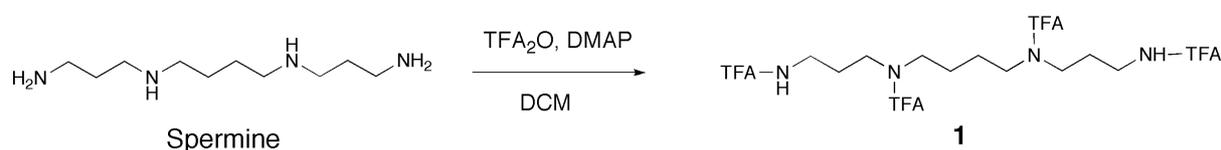


Figure 41 : Synthèse de la spermine tétra-trifluoroacétylée **1**

Le produit brut **1** obtenu est ensuite traité par du dicarbonate de di-(*tert*-butyle), toujours sous activation par de la DMAP. On suppose qu'il se produit alors une protection des amines primaires de la spermine par les groupements Boc malgré la présence des groupements protecteurs TFA. Après recristallisation dans le méthanol, on obtient la spermine **2** présentant

des groupements protecteurs orthogonaux sur ses amines primaires et secondaires. En effet, lors du traitement dans le méthanol, les groupements protecteurs TFA se déprotègent spontanément des amines primaires en ne laissant pour seule protection que les groupements Boc (Figure 42).

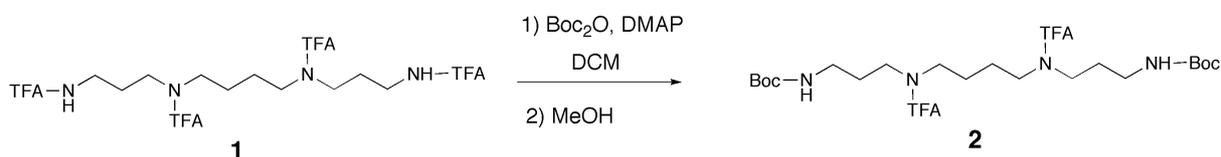


Figure 42 : Synthèse de la spermine tétraprotégée 2

À ce stade de la synthèse, il paraissait opportun de déprotéger les groupements Boc pour introduire d'une part la fonction thiourée, d'autre part, le groupement MMT, puisque les groupements TFA peuvent être déprotégés dans des conditions compatibles avec la synthèse d'oligonucléotides (en présence d'une solution d'ammoniaque concentrée pendant une nuit). Or, lors de la déprotection des groupements Boc par de l'acide trifluoroacétique en excès puis passage sur une colonne échangeuse d'ions, on a constaté que les groupements TFA migrent des amines secondaires vers les amines primaires de la spermine (Figure 43). Un phénomène similaire a également été observé par Hesse et coll. [213]. Ce transfert intervient via un mécanisme de cyclisation à 6 atomes, privilégié par le fait que les amines primaires de la spermine sont séparées de 3 carbones des amines secondaires.

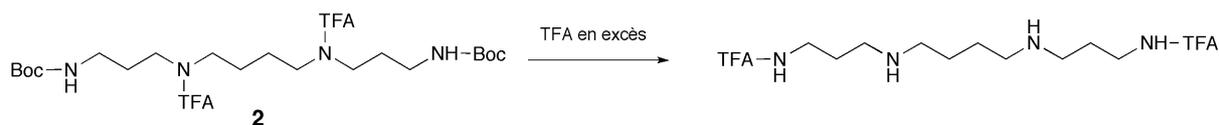


Figure 43 : Migration des groupements trifluoroacétyles sur les amines primaires

Il a semblé alors plus judicieux de déprotéger les groupements TFA en présence d'un excès de soude (Figure 44), et de protéger à nouveau le produit 3 ainsi obtenu à l'aide de groupements protecteurs carbamates, qui ne pourraient pas se transposer des amines secondaires aux amines primaires.

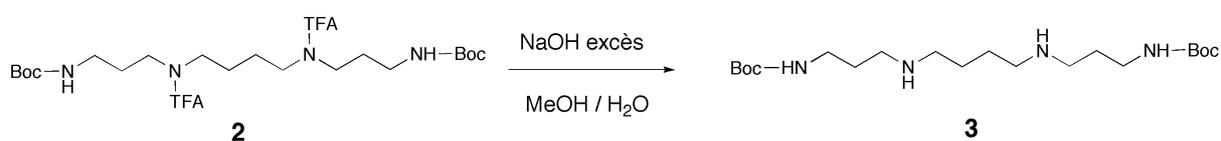
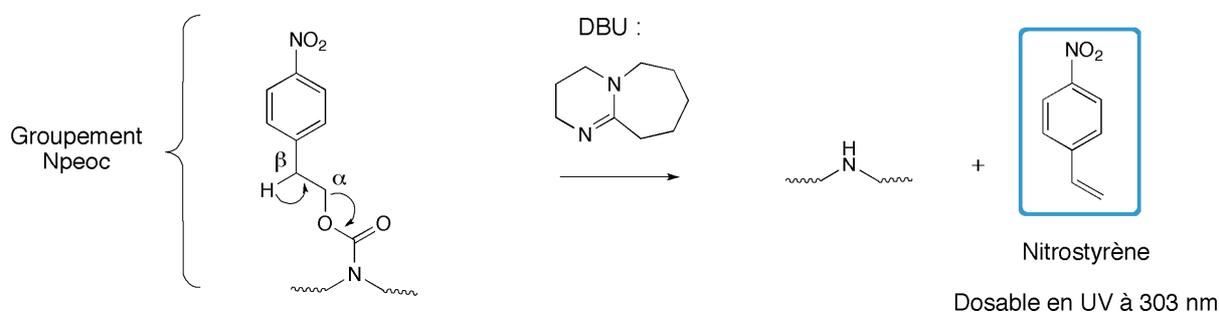


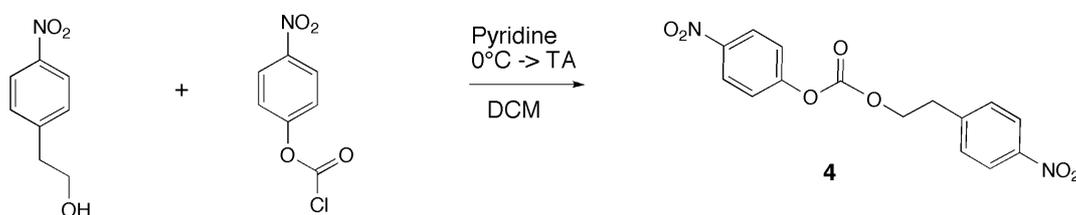
Figure 44 : Synthèse de la spermine diprotégée 3

Pour cela, nous avons choisi d'introduire le groupement Npeoc, décrit par le groupe de Pfleiderer comme compatible avec la synthèse d'oligonucléotides [214]. Ce groupement carbamate se déprotège par  $\beta$ -élimination en présence d'une base non nucléophile, le DBU, à une concentration de 1 M dans l'acétonitrile en libérant du nitrostyrène (Figure 45).



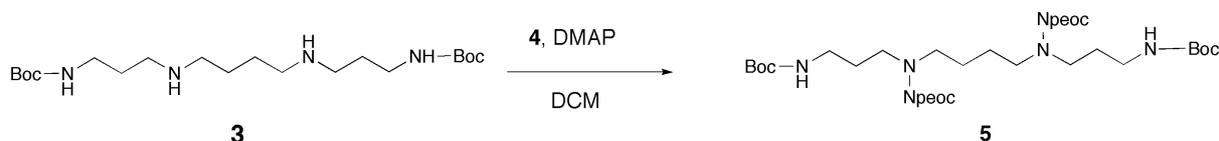
**Figure 45 : Déprotection des groupements Npeoc et libération de nitrostyrène**

Il sera donc possible d'effectuer un suivi de la déprotection des groupements Npeoc en dosant en UV à 303 nm, le nitrostyrène libéré. Afin d'insérer les groupements Npeoc sur les amines secondaires de la spermine **3**, un carbonate **4** a préalablement été synthétisé avec un rendement de 77%, en faisant réagir du 4-nitrophényl alcool avec du chloroformiate de 4-nitrophényle, sous activation par de la pyridine (Figure 46).



**Figure 46 : Synthèse du carbonate 4**

Le nitrophénol constituant un excellent groupe partant, c'est exclusivement la protection Npeoc qui est incorporée sur les amines secondaires de la spermine à l'aide du carbonate **4** et de DMAP pour donner la spermine **5**, protégée avec des groupements protecteurs orthogonaux (Figure 47).

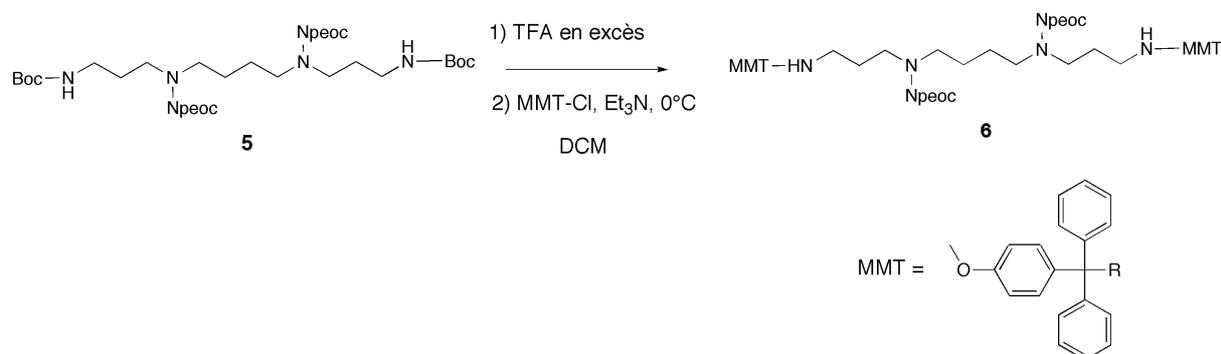


**Figure 47 : Synthèse de la spermine tétraprotégée 5**

Toutes ces synthèses servant à la différenciation des amines primaires et secondaires de la spermine sont réalisées avec un rendement par étape >90%. Chaque produit est obtenu par précipitation ou cristallisation avec une très grande pureté et ne requiert donc pas de purification par colonne chromatographique, souvent fastidieuse dans le cas de polyamines.

## B. Introduction d'un groupement protecteur MMT dosable à 478 nm

Le couplage de la spermine devant s'effectuer sur un support solide, il est difficile d'évaluer le rendement de la réaction entre l'amine portée par le support et la thiourée **8**. Parer l'amine primaire distale du synthon **8** d'un groupement protecteur dosable en UV-visible permet d'évaluer le rendement de couplage de la spermine. Par analogie avec la protection trityle DMT utilisée classiquement en synthèse d'oligonucléotides, le groupement MMT a été spécialement développé pour la protection des amines. Par traitement acide, il permet de libérer un cation  $\text{MMT}^+$  dosable à 478 nm. L'introduction de ce groupement protecteur sur la spermine implique au préalable la déprotection des groupements Boc présents sur les amines primaires du composé **5**. Pour ce faire, le composé **5** est d'abord traité par de l'acide trifluoroacétique en excès. Puis la tritylation des amines primaires est effectuée à l'aide de chlorure de 4-monométhoxytrityle en présence d'un large excès de triéthylamine pour donner la spermine tétraprotégée **6** avec un rendement de 79% (Figure 48). Cet excès de triéthylamine est utilisé pour neutraliser l'acide trifluoroacétique résiduel, pour déprotoner les amines primaires et pour capter l'acide chlorhydrique généré par la réaction de tritylation.



**Figure 48 : Introduction du groupement protecteur MMT dosable en visible**

La mono-détritylation est ensuite effectuée en présence de TFA pour donner le produit **7** (Figure 49). Le composé bi-tritylé **6** n'ayant pas réagi lors de l'étape de mono-détritylation peut être récupéré par colonne chromatographique et recyclé aisément en le soumettant à un

nouveau cycle de déprotection. Au bout de trois cycles de synthèse, on obtient alors un rendement de 62%.

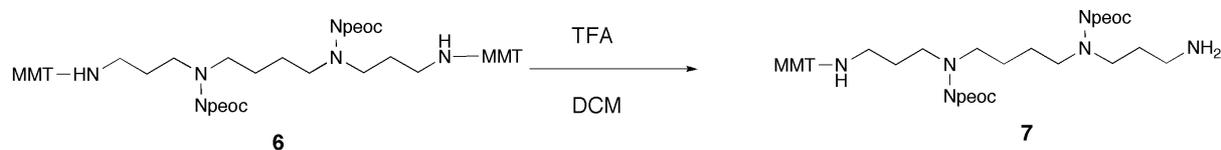


Figure 49 : Obtention du produit mono-détritilé 7

D'un point de vue synthétique, il a paru plus pratique de réaliser une bi-tritylation du composé suivie d'une mono-détrylation, ces deux étapes étant beaucoup plus faciles à contrôler qu'une simple étape de mono-tritylation (par ailleurs testée) et donnant de meilleurs rendements par recyclage du produit 6.

### C. Incorporation de la fonction réactive : la thiourée

Pour qu'il y ait réaction de guanidinylation entre une amine et une thiourée, il faut que la thiourée porte un groupement protecteur « activant » permettant d'obtenir des rendements élevés. Dans la littérature, en solution comme sur support solide, les thiourées utilisées sont souvent soit des carbamoyl-thiourées mono ou bi-protégées [122, 128, 208, 215-219], soit des Pbf-thiourées [209-211, 220-223]. Cependant, cette dernière protection n'est pas compatible avec la présence d'oligonucléotides, puisqu'elle requiert une déprotection en milieu acide fort, ce qui pourrait engendrer une dépurination des oligonucléotides. Nous avons donc choisi d'introduire une thiourée protégée par le groupement carbamate Fmoc. En effet, ce groupement protecteur est labile dans des conditions basiques douces, compatibles avec la synthèse d'oligonucléotides, et a déjà été utilisé dans ce contexte par Bruice et coll. [122, 126, 128]. La formation de la thiourée 8 est donc effectuée simplement par réaction instantanée entre l'amine 7 et du Fmoc-isothiocyanate.

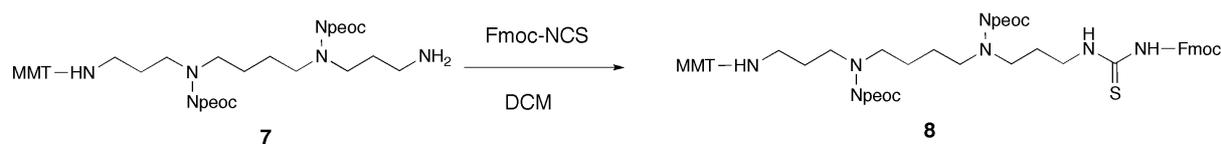
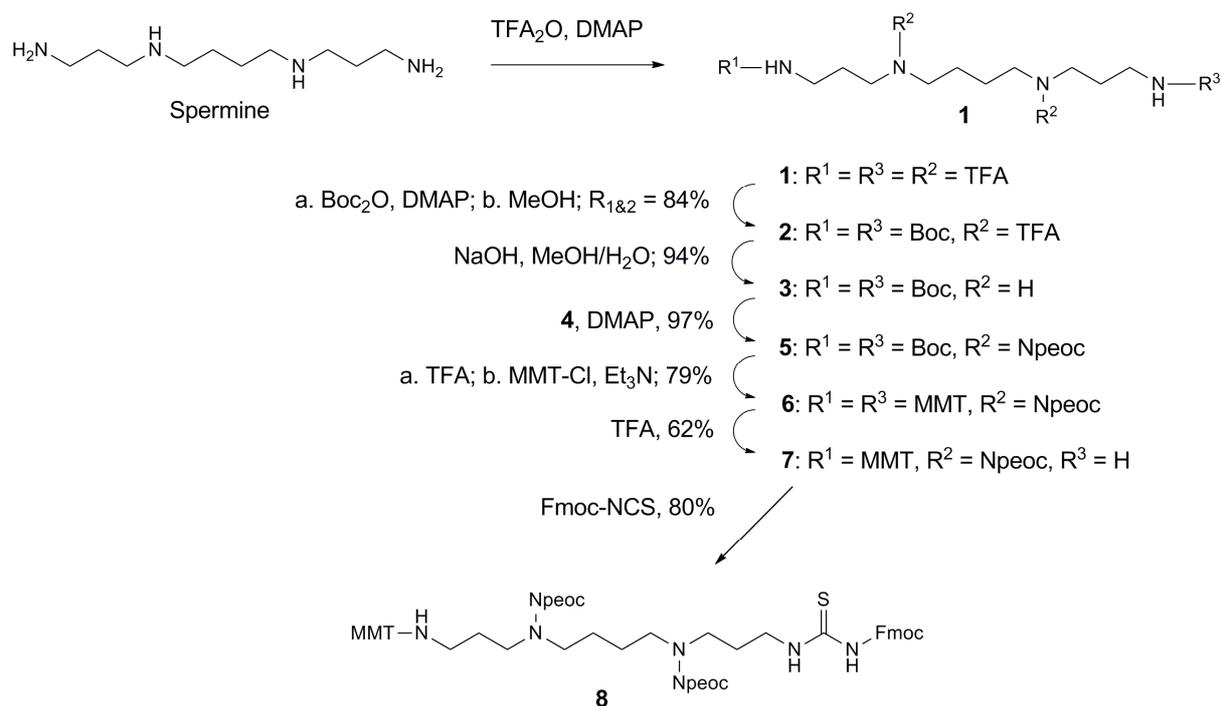


Figure 50 : Introduction de la fonction thiourée

D. Schéma récapitulatif de synthèse du synthon spermine **8**Figure 51 : Schéma de synthèse de la thiourée **8**

Le rendement global de cette synthèse est de 24% (12 mmol de synthon **8**).

E. Validité du synthon **8** : tests en solution

Plusieurs tests en solution ont été réalisés de façon préliminaire afin de déterminer la facilité de déprotection des différents groupements protecteurs, dans des conditions compatibles avec la synthèse d'oligonucléotides.

## 1. Test de déprotection des groupements Npeoc en solution

Afin de s'assurer que les groupements Npeoc de notre synthon se déprotègent facilement, nous avons effectué un suivi de leur déprotection en présence d'une solution de DBU 1 M, en dosant en UV à 303 nm les groupements nitrostyrènes libérés (Figure 45). Pour que le dosage ne soit pas perturbé par le clivage concomitant des groupements Fmoc présents sur le synthon **8**, la molécule modèle utilisée pour cette expérience est la diamine **6**. Pour des raisons pratiques de visualisation en UV à 303 nm, la concentration de la solution mère en

diamine **6** a été fixée à 10 mM, celle en DBU est de 1 M dans l'acétonitrile. À intervalles de temps réguliers, 50  $\mu$ L de solution sont prélevés et dilués pour suivi en UV. D'après ce suivi (Figure 52), la déprotection des groupements Npeoc en solution est totale au bout de 2 h. Ce résultat est cohérent avec le temps de déprotection préconisé par Eritja et coll. [224].

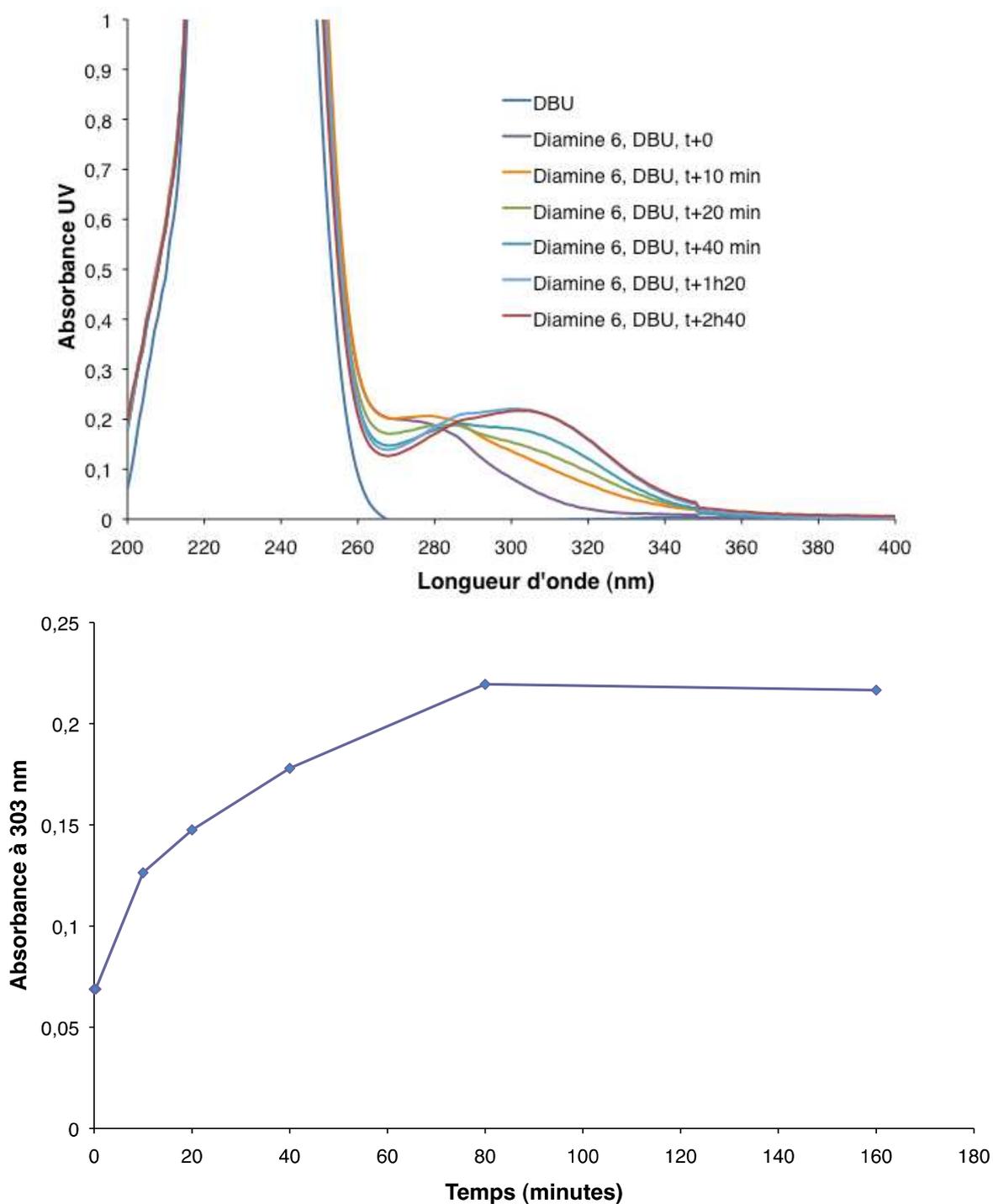
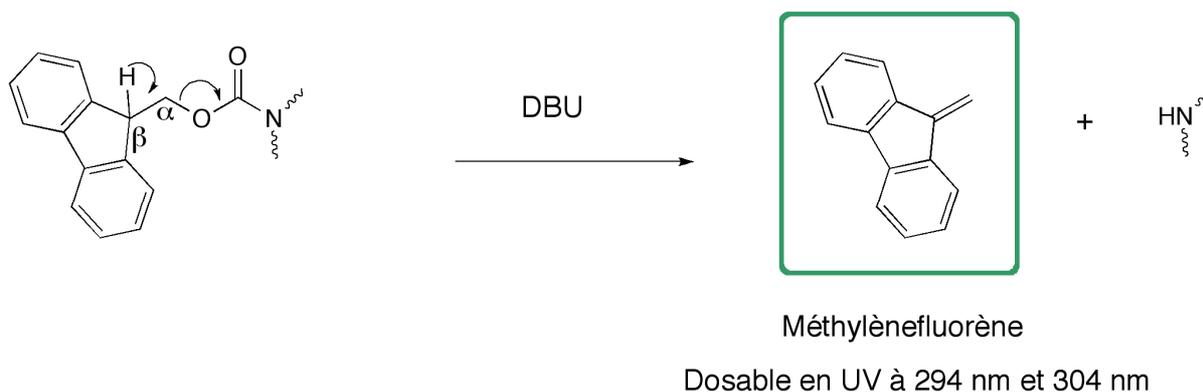


Figure 52 : Déprotection des groupements Npeoc par une solution de DBU 1 M

## 2. Test de déprotection des groupements Fmoc en solution

Lorsque le groupement Fmoc est déprotégé par une solution de DBU 3% (Figure 53), il génère par  $\beta$ -élimination du méthylènefluorène, dosable en UV, qui présente des maxima d'absorption aux longueurs d'onde 294 nm et 304 nm [225].



**Figure 53 : Déprotection du groupement Fmoc et libération de méthylènefluorène**

De la même façon que précédemment, une molécule modèle est utilisée pour mimer la déprotection des oligonucléotides conjugués : le synthon **8** dont la concentration est fixée à 10 mM est déprotégé par une solution de DBU 3% dans l'acétonitrile. Un suivi UV aux deux longueurs d'ondes caractéristiques du méthylènefluorène montre que la déprotection des groupements Fmoc est quasi instantanée et complète en 10 min (Figure 54). La déprotection par une solution de DBU plus concentrée (1 M) envisagée pour le traitement des oligonucléotides conjugués devrait a fortiori déprotéger tous les groupements Fmoc.

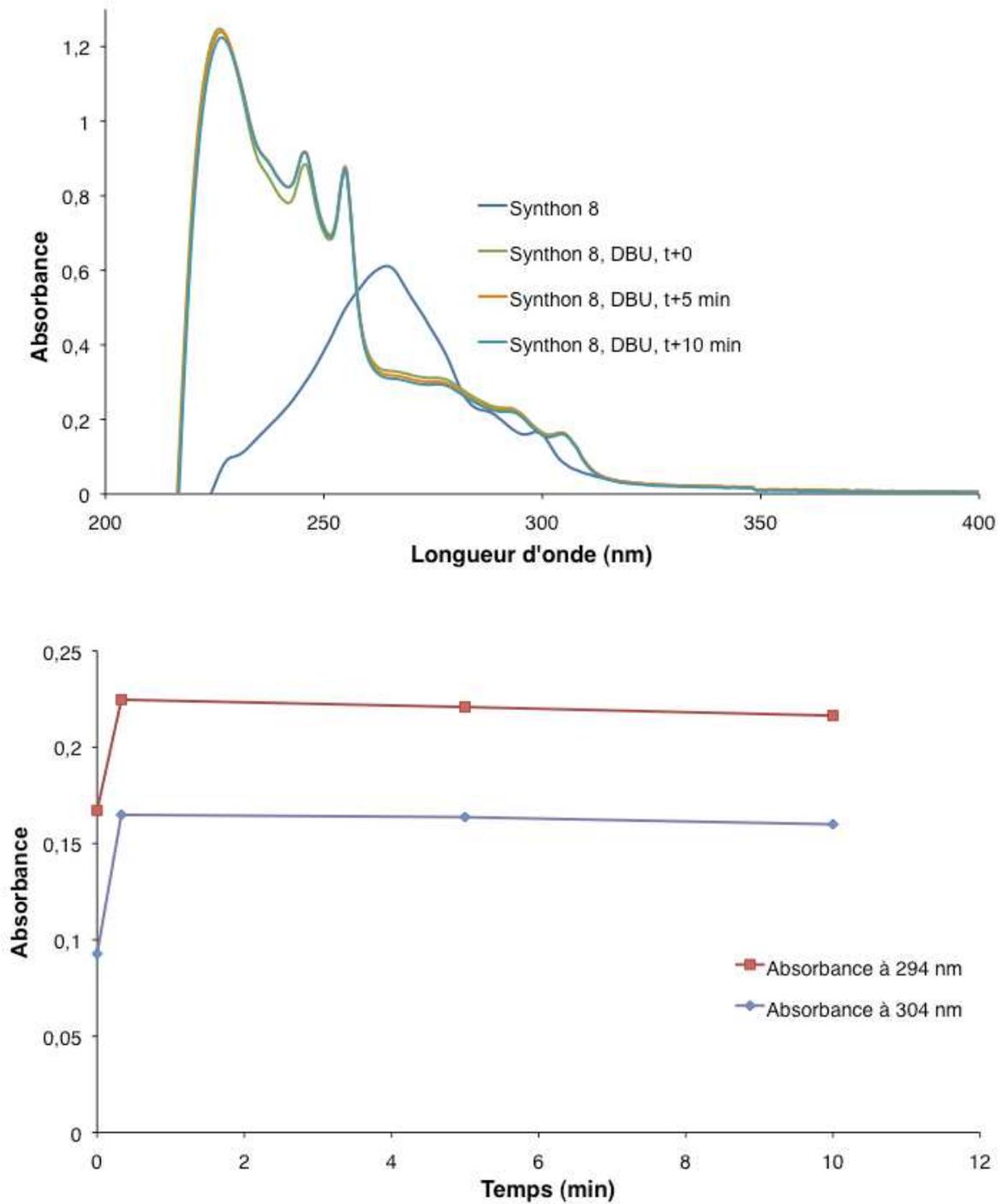


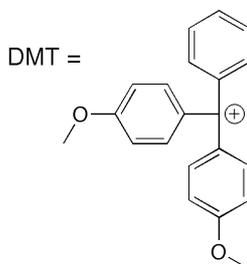
Figure 54 : Déprotection des groupements Fmoc par une solution de DBU 3%

### III. COUPLAGE DE SPERMINES EN 5'

Le couplage de guanidospermines est réalisé, dans un premier temps, à l'extrémité 5' d'un décimère ADN. Les oligonucléotides guanidospermines correspondants seront notés  $GS_n[N]_{10}$  (pour 5'-(GuanidinoSpermines)<sub>n</sub>-[Nucléotides]<sub>10</sub>-3'). Ils sont obtenus en trois étapes : 1) synthèse de l'oligonucléotide, 2) introduction d'une fonction amine en 5', 3) couplage du synthon spermine **8**.

#### A. Synthèse d'oligonucléotides décimères

La séquence ADN utilisée pour la synthèse des décimères à coupler avec les spermines est la suivante : 5'-CGCATGCCAC-3'. Elle correspond à une séquence du gène de la protéine fluorescente verte, comporte les 4 bases A, C, G et T, et représente environ un pas d'hélice ADN. Cette séquence a déjà été employée au sein de notre laboratoire pour évaluer la première génération d'oligonucléotides conjugués à des spermines évoquée au chapitre 1 (p.51) [226, 227]. Les décimères ont été réalisées de façon automatisée sur un synthétiseur d'oligonucléotides à partir d'une colonne dC-CPG d'1  $\mu$ mol, à l'aide de phosphoramidites ADN standards, en effectuant des modifications mineures au cycle classique de synthèse d'oligonucléotides ADN. Ce cycle classique de synthèse s'effectue de la façon suivante (Figure 56) : dans un premier temps, le nucléotide porté par un support solide (CPG) est détritylé par passage d'une solution de TCA 3% dans du DCM. Le cation  $DMT^+$  généré par cette étape de déprotection (Figure 55) absorbe à 503 nm et permet l'évaluation du rendement de couplage des nucléotides.



Cation dosable en UV-visible à 503 nm

**Figure 55 : Groupement DMT**

La deuxième étape consiste en l'activation d'un nucléotide présentant une fonction phosphoramidite par un activateur tétrazole. Ce phosphoramidite est alors couplé à la fonction alcool du nucléotide porté par le support. Le lien phosphite ainsi formé est ensuite oxydé en groupement phosphate à l'aide d'une solution de diiode dans de l'eau. Enfin, les sites actifs n'ayant pas réagi sont bloqués par une solution d'anhydride acétique en présence de *N*-méthylimidazole. Ceci permet d'éviter l'obtention de séquences tronquées ou présentant des délétions. Pour une simplification du discours, cette étape sera appelée étape de cap ou capping tout au long de ce mémoire et désignera tous les processus d'inactivation de fonctions réactives restées intactes lors d'un couplage. Le cycle est ensuite répété pour l'introduction du nombre souhaité de nucléosides.

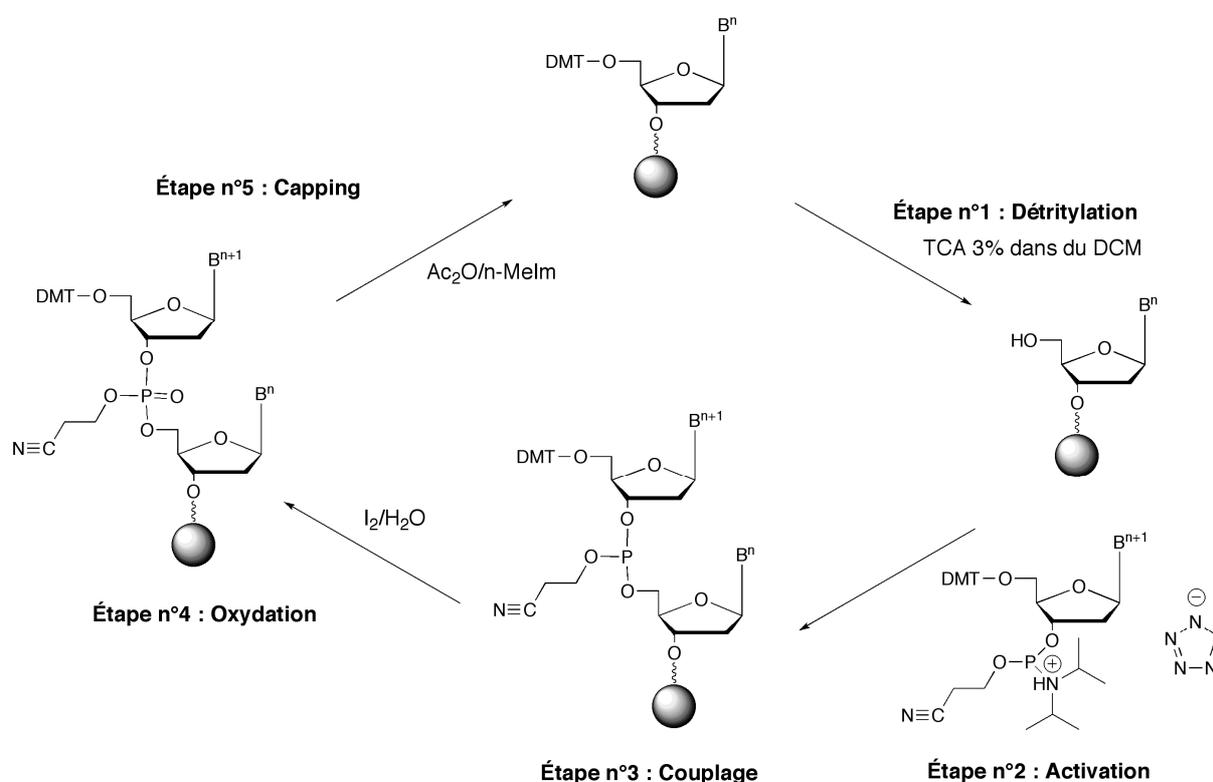


Figure 56 : Cycle de couplage d'un nucléotide

L'évaluation du rendement de couplage est donnée par le ratio des absorbances à 503 nm des solutions de DMT<sup>+</sup> des nucléotides n+1 et n. Pour une synthèse classique, le dernier groupement DMT n'est généralement pas déprotégé, et permet la purification ultérieure de l'oligonucléotide sur une cartouche PolyPak. Dans ce cas précis cependant, l'oligonucléotide est détritilé pour permettre le couplage d'un 5'-amino-modifier-C6.

## B. Introduction d'une amine en 5'

La fonction amine, nécessaire au couplage de l'oligonucléotide avec la thiourée **8**, est introduite par le biais d'un 5'-amino-modifier-C6 (Glen research, Figure 57), noté plus simplement amino-modifier par la suite.

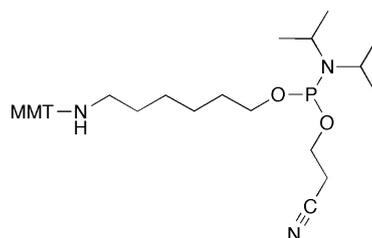


Figure 57 : 5'-Amino-modifier-C6

Il s'agit d'un phosphoramidite séparée d'une fonction amine protégée par une chaîne de 6 carbones. Elle est insérée à l'extrémité 5' des décimères de façon automatisée, en adaptant le cycle de couplage classique des nucléotides. Afin de vérifier le bon déroulement du couplage, un décimère témoin est décroché du support et déprotégé tout en conservant sa protection MMT finale. La présence de ce groupement trityle sur l'oligonucléotide a pour conséquence de retarder le temps de rétention du composé en HPLC.

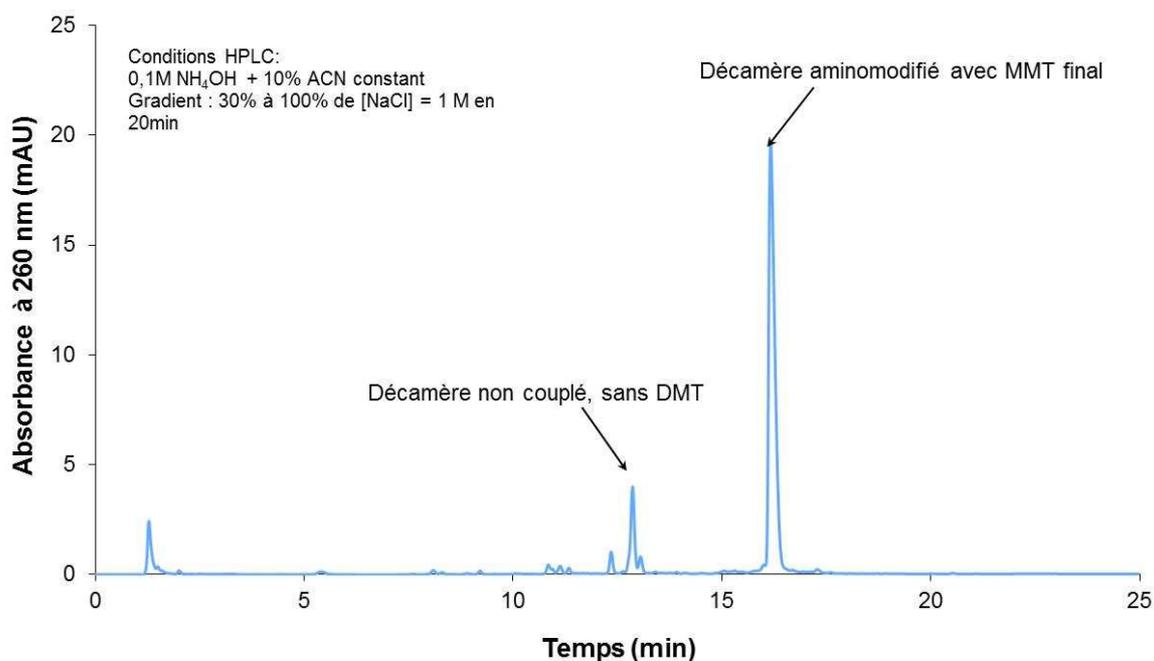


Figure 58 : Spectre HPLC brut du couplage de l'amino-modifier

L'analyse du spectre HPLC brut (Figure 58) confirme le bon couplage de l' amino-modifier, en affichant un temps de rétention de 16,2 min pour l'oligonucléotide amino-modifié portant un groupement MMT final par rapport à un temps de rétention de 12,3 min pour l'impureté oligonucléotide non modifié, sans protection trityle finale. Après purification, le temps de rétention du décamère amino-modifié détritylé est de 12,1 min. Le groupement MMT permet également de déterminer les rendements de couplage de l' amino-modifier. Avant couplage avec la spermine **8**, il est déprotégé par une solution de TCA 3%, selon un protocole modifié par rapport à la déprotection du groupement DMT. Le cation MMT<sup>+</sup> résultant présente un maximum d'absorption à 478 nm et est dosé en visible. Connaissant l'absorbance du dernier DMT présent sur l'oligonucléotide, il devient possible d'estimer le rendement de couplage selon la formule suivante :

$$R = \frac{A_{478} \times \text{Corr.UV}}{A_{503}}$$

où  $A_{478}$  est l'absorbance du MMT,  $A_{503}$  est l'absorbance du dernier DMT et Corr. UV est un facteur de correction entre l'absorbance du MMT à 478 nm et l'absorbance du DMT à 503 nm, à concentrations équivalentes. Ce facteur de correction est de 1,36. Les rendements de couplage de l' amino-modifier obtenus dans ces conditions sont compris entre 82,3% et 99,9%.

### C. Couplage de la spermine **8** sur un décamère aminomodifié

Afin de coupler la spermine **8** aux décamères aminomodifiés (Figure 59), il a fallu déterminer les conditions optimales de réaction. Tout d'abord, afin d'assurer une réactivité suffisante du synthon **8** sur support solide, nous avons envisagé de concentrer au maximum les réactifs de couplage. Sachant que l'on travaille à une échelle d'1  $\mu\text{mol}$ , le volume intérieur de la colonne contenant l'oligonucléotide a été évalué à 130  $\mu\text{L}$ . Pour éviter des bulles d'air qui pourraient être préjudiciables à la réaction, le volume minimal de solution de réactifs à passer sur la colonne a été fixé à 330  $\mu\text{L}$ , pour un nombre d'équivalents en synthon **8** par rapport à l'oligonucléotide aminomodifié de 30 éq. À partir de ce postulat, plusieurs paramètres ont été testés : le solvant, l'activateur, la base, et le temps de réaction.

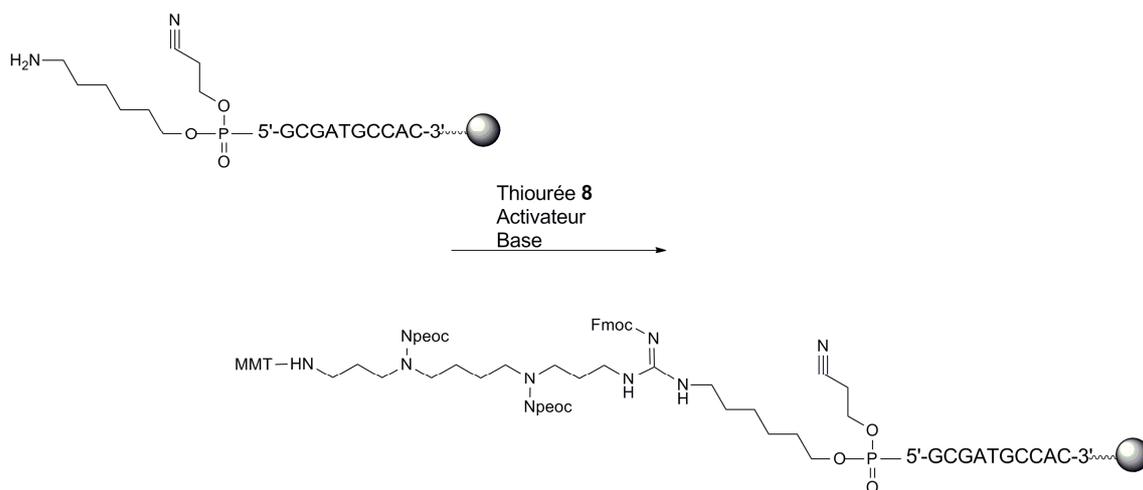


Figure 59 : Couplage de spermine sur décimère amino-modifié

### 1. Choix du solvant

Initialement, le synthon **8** a été conçu pour être éventuellement couplé sur synthétiseur. Dans cette optique, les trois solvants connus pour être compatibles avec l'appareillage utilisé : l'acétonitrile, le DCM et le THF ont été testés. Le DMF a également été expérimenté, ayant été décrit pour la réaction de guanidinylation [218]. Afin de déterminer le solvant optimal, de simples essais de solubilité et/ou d'évaluation de rendement de couplage ont été effectués (Tableau 2). Lors des tests de solubilité, les échantillons ont été homogénéisés pour assurer une bonne dissolution des composés.

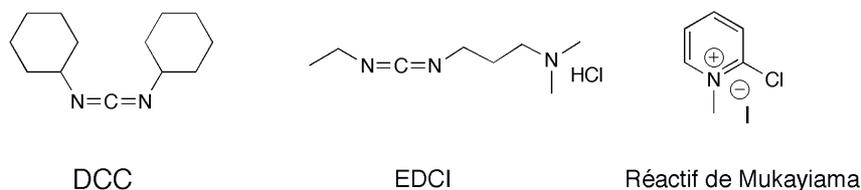
[Synthon <b>8</b> ] <sub>max</sub>	Solvant	Solubilité	R <sub>max</sub> obtenu
1 M	DCM	Soluble	84%
0,03 M	Acétonitrile	Soluble en insistant	Non testé
1 M	DMF	Soluble	54%
0,1 M	Acétonitrile : DMF 90 : 10	Soluble	Non testé
0,1 M	Acétonitrile : DMF 95 : 5	Soluble en insistant	Non évalué
0,1 M	Acétonitrile : DCM 90 : 10	Soluble	Non testé
0,1 M	Acétonitrile : DCM 95 : 5	Soluble en insistant	Non testé
0,1 M	THF	Non soluble	Non testé

Tableau 2 : Test de solvants pour la réaction de guanidinylation

Ces résultats montrent que le synthon **8** est peu soluble dans l'acétonitrile, principal solvant utilisé sur synthétiseur. Pour résoudre ce problème, des mélanges acétonitrile : DMF ou acétonitrile : DCM peuvent être envisagés. Toutefois, c'est le dichlorométhane qui semble le plus indiqué pour la réaction de couplage et qui a été conservé pour la suite des réactions. L'utilisation du DMF comme solvant de réaction aurait également pu être plus longuement étudiée, cependant, le DMF a une viscosité bien plus importante que le DCM et n'était pas conforme à l'idée initiale d'effectuer le couplage sur le synthétiseur.

## 2. Choix de l'activateur

L'un des activateurs les plus connus pour la réaction de guanidinylation à partir d'une thiourée est le chlorure de mercure (II) :  $\text{HgCl}_2$ . Ce composé est néanmoins très toxique et néfaste pour l'environnement [223]. C'est pourquoi de nouveaux agents d'activation aux performances comparables, voire améliorées, tels que l'EDCI ou le réactif de Mukaiyama, ont été employés comme solutions alternatives. Pour ces raisons, et bien que  $\text{HgCl}_2$  soit toujours utilisé par Bruice et coll. dans un contexte très similaire au nôtre [212], nous avons préféré éviter l'utilisation de ce réactif. Plusieurs activateurs ont été testés pour la réaction de guanidinylation : le DCC, le réactif de Mukaiyama et l'EDCI (Figure 60).



**Figure 60 : Activateurs testés pour la réaction de guanidinylation**

Ces activateurs permettent d'obtenir une fonction guanidine par 1) attaque nucléophile de la fonction thiourée sur l'activateur puis 2) passage par un carbodiimide intermédiaire, suivi par 3) une attaque nucléophile d'une fonction amine sur le carbodiimide. Pour le cas de l'activation par EDCI, ce mécanisme est peut-être réduit à une attaque nucléophile de l'amine directement sur l'intermédiaire thiourée-EDCI (Figure 61) [206, 218, 228].

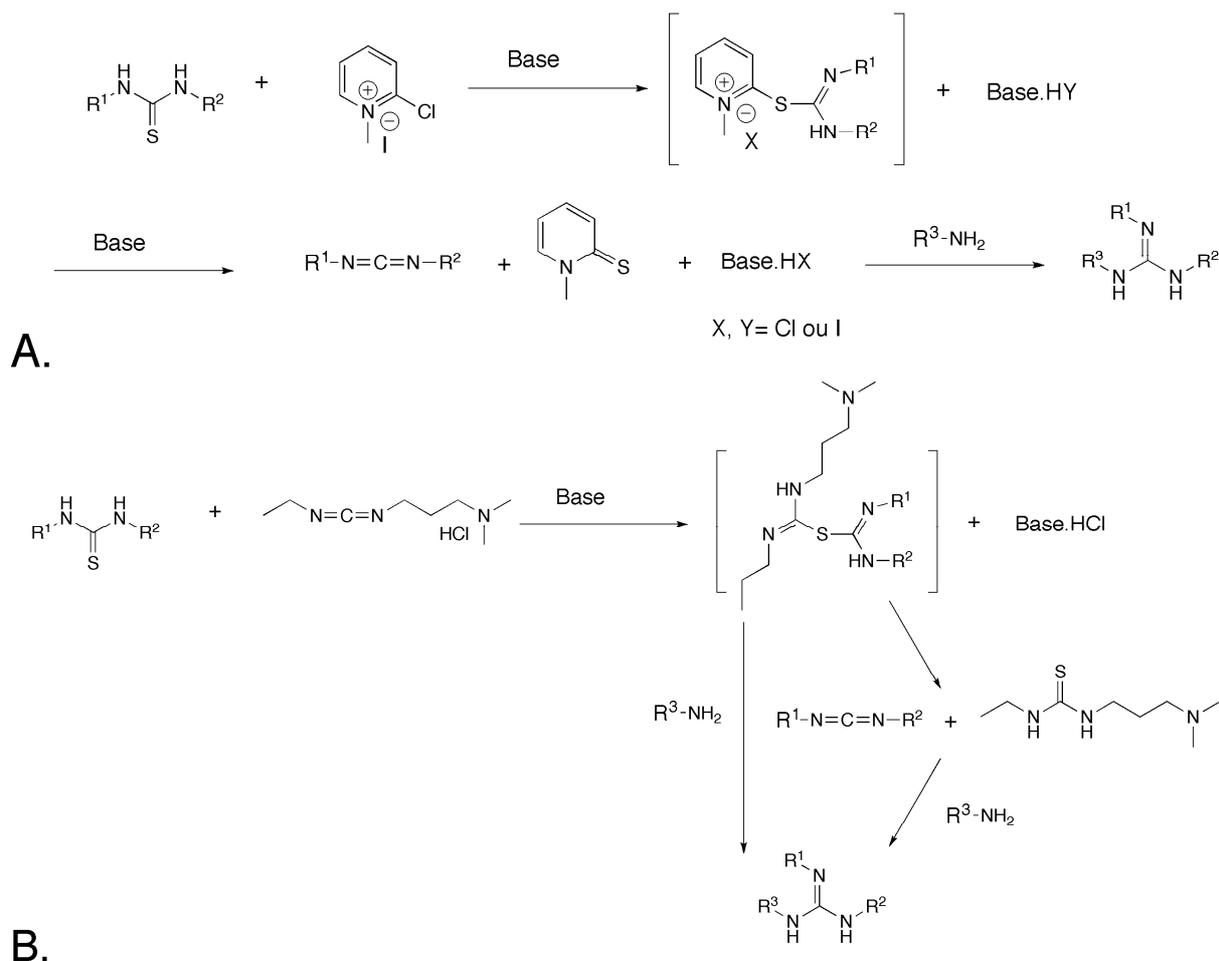
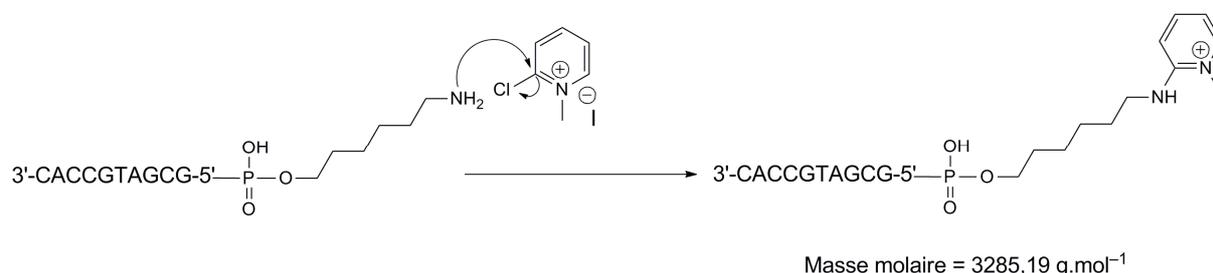


Figure 61 : Mécanismes de formation de la fonction guanidine

A. Mécanisme de couplage via le réactif de Mukaiyama. B. Mécanisme de couplage via EDCI

La quantité d'activateur par rapport à la thiourée **8** a été fixée à 2,2 éq., en se basant sur les protocoles de la littérature pour des couplages en solution ou sur support solide (entre 1 et 2,5 éq. par rapport à la thiourée) [208, 215-220, 223, 228, 229]. Le réactif de Mukaiyama est décrit comme un activateur très efficace pour la formation de guanidines à partir de carbamoyl-thiourées bi-protégées [218]. Bien que notre thiourée **8** ne comporte qu'un seul groupement carbamate, nous avons tout de même testé les capacités de cet activateur, en utilisant le DMF comme solvant. Or, en suivant le protocole standard de couplage, le produit majoritaire formé, caractérisé par spectrométrie de masse, ne correspond pas au produit attendu, mais au produit de substitution nucléophile de l'amine du décamer aminomodifié sur le réactif de Mukaiyama (Figure 62).

$M_{\text{attendue}} \text{ (g.mol}^{-1}\text{)}$	$M_{\text{produit secondaire}} \text{ (g.mol}^{-1}\text{)}$	$M_{\text{obtenue}} \text{ (MALDI-TOF)}$
3420	3285	3283

**Figure 62 : Substitution nucléophile**

En mettant le réactif de Mukaiyama en défaut (0,5 eq, 15  $\mu\text{mol}$ ) par rapport à la thiourée **8**, et en « préactivant » la thiourée **8** pendant 30 min en présence de DIPEA avant le passage de cette solution sur le décamer aminomodifié, la formation de ce produit secondaire est limitée mais persistante. L'ensemble des résultats obtenus pour le test de couplage avec les différents activateurs est rapporté dans le Tableau 3. Ces résultats montrent clairement que l'EDCI est le meilleur activateur pour la réaction de guanidinylation sur support solide. Cette conclusion est cohérente avec ce qui a déjà été observé par Anslyn et coll. [208]. Le DCC ne permet pas un couplage efficace, même pour 24 h de réaction.

Activateur	Rendement maximal obtenu
EDCI	84%
DCC	15%
Réactif de Mukaiyama (protocole standard)	Obtention majoritaire d'un produit secondaire
Réactif de Mukaiyama (15 $\mu\text{mol}$ , 0,5 eq.)	48% (23% produit secondaire)

**Tableau 3 : Test d'activateurs pour la réaction de guanidinylation**

### 3. Choix de la base

Le synthon **8** portant un groupement Fmoc relativement labile, le couplage doit être effectué en conditions basiques « douces » afin d'éviter une déprotection prématurée de la thiourée avant réaction. Pour cela, trois bases ont été testées : la DIPEA (base de Hünig, pKa = 10,5), la pyridine (pKa = 5,2) et la *N*-méthylimidazole (pKa = 7,4). La DIPEA présente un pKa

proche de la triéthylamine (10,7) mais est beaucoup plus encombrée, et donc moins susceptible de déprotéger le groupement Fmoc. Les résultats obtenus pour les trois bases testées sont donnés dans le Tableau 4. Au vu des résultats, c'est la DIPEA qui a été conservée pour la suite des réactions.

Bases testées	Rendement maximal obtenu
DIPEA	84%
Pyridine	21%
1-méthylimidazole	25%

Tableau 4 : Test de différentes bases pour la réaction de guanidinylation

#### 4. Choix du temps de réaction

Initialement, le temps de couplage testé était de 24 h, afin de s'assurer que la réaction soit complète. Plusieurs essais ont par la suite montré que cette durée pouvait être abaissée à 4 h sans affecter le rendement de couplage. C'est donc une durée de 4 h qui est retenue pour la suite des expériences.

### D. Déprotection et purification des oligonucléotides

#### 1. Déprotection des groupements Npeoc et Fmoc

Après couplage d'une ou plusieurs spermines sur le décamère aminomodifié, les groupements Npeoc portés par les spermines sont déprotégés sur la colonne à l'aide d'une solution de DBU 1 M dans l'acétonitrile pendant 3 h. Par rapport à ce qui a été observé en solution, la durée de déprotection a été augmentée afin de s'assurer que tous les groupements Npeoc ont été enlevés de l'oligonucléotide.

## 2. Clivage de l'oligonucléotide du support et déprotection des bases

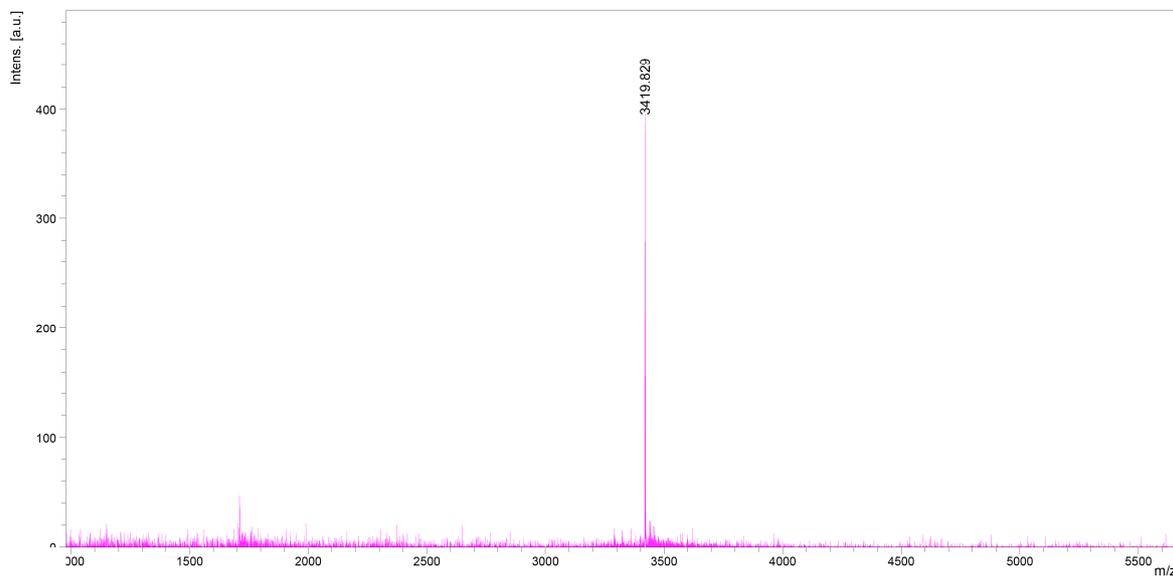
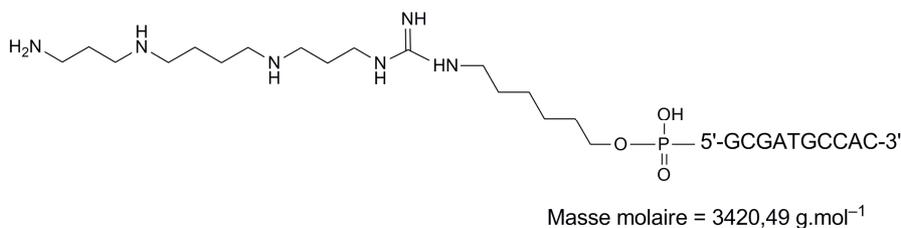
Après déprotection des Npeoc, l'oligonucléotide conjugué est décroché du support et déprotégé une nuit dans de l'ammoniac aqueux 28% à température ambiante.

## 3. Purification des oligonucléotides 5'-guanidinospermines

Les oligonucléotides ont été purifiés sur cartouche PolyPak II. Il s'agit d'une colonne contenant une résine polymérique sur lequel les protections trityles terminales sont retenues. Les séquences tronquées étant détritylées au cours des cycles de synthèse, seul le bon produit possède une protection trityle finale. Dans le cas de notre oligonucléotide conjugué en 5' à des guanidinospermines, il s'agit du groupement MMT. Il va alors être possible de faire éluer en premier lieu les séquences tronquées, puis de cliver le groupement MMT de l'oligonucléotide souhaité, avant de faire éluer l'oligonucléotide purifié. Le groupement MMT ne se déprotègeant pas aussi facilement que le groupement classique DMT, le protocole de purification a été modifié au niveau de l'étape de déprotection : les volumes de solution de détritylation (TFA 2%) et les temps de déprotection sont augmentés. Lorsque nécessaire, certains oligonucléotides ont subi une purification supplémentaire par HPLC, puis ont été dessalés à l'aide de cartouche NAP-25.

## E. Résultats obtenus et limitations

Les expériences de mise au point du couplage de la spermine **8** sur un décamère aminomodifié ont permis d'établir les conditions optimales de réaction (solvant : DCM, activateur : EDCI, base : DIPEA) et de démontrer que le réactif de Mukaiyama est inadapté pour l'activation du couplage. Le couplage de spermines en 5' a abouti sur l'obtention d'un produit GS<sub>1</sub>[N]<sub>10</sub> purifié et caractérisé par HPLC et par spectrométrie de masse (Figure 63). La caractérisation des oligonucléotides par spectrométrie de masse est plus amplement décrite plus loin (p.100).



**Figure 63 : Décamère conjugué en 5' à une spermine**

Un deuxième composé synthétisé : l'oligonucléotide GS<sub>2</sub>[N]<sub>10</sub> purifié une première fois en HPLC puis dessalé montre deux pics majoritaires en HPLC. Le spectre de masse indique que l'un des pics correspond au décamère aminomodifié ( $M = 3192,14 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $M_{\text{trouvée}} = 3214,52 \text{ g.mol}^{-1}$  [M+Na]), l'autre correspond au produit attendu ( $M = 3648,85 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $M_{\text{trouvée}} = 3668,85 \text{ g.mol}^{-1}$  [M+Na]). La faible quantité d'oligonucléotide GS<sub>2</sub>[N]<sub>10</sub> résiduelle (15 nmol) n'autorise pas un nouveau cycle de purification par HPLC/dessalage pour obtenir le produit pur. Des essais de couplages supplémentaires n'ont pas permis d'obtenir d'oligonucléotides portant davantage de spermines.

Plusieurs paramètres peuvent expliquer les limitations à ces résultats. En premier lieu le rendement de couplage des spermines en 5' est insuffisant : il plafonne à 84%, et atteint en moyenne 58%, malgré un excès de 30 éq. en thiourée / 66 éq. en activateur et base par rapport aux fonctions amines des décamères. D'autre part, il est probable que les protections cyanoéthyles des phosphates soient peu stables aux conditions du couplage. Capaldi et al. rapportent en effet une méthode de déprotection de groupements cyanoéthyles à l'aide d'amines tertiaires, dont la DIPEA [230]. Bien que la concentration utilisée pour nos

expériences (0,2 M) soit 35 fois moindre que la concentration en base évoquée dans ces travaux, il n'en demeure pas moins qu'un couplage répété de spermines puisse aboutir à une déprotection partielle des groupements cyanoéthyles, perturbant ainsi la réaction de couplage. Pour ces raisons, il a été décidé d'effectuer le couplage de spermines non plus à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide, mais à son extrémité 3'. Outre le fait que l'on s'affranchit ainsi du problème de la protection cyanoéthyle des phosphates, le choix de la séquence de l'oligonucléotide à coupler sur les spermines devient libre. Étant donnés les temps de réaction et les rendements obtenus, l'exécution des couplages des guanidinospermines sur synthétiseur n'est plus envisageable. En revanche, il devient intéressant de réaliser un support conjugué manuellement à des spermines à grosse échelle, pour couplage ultérieur de séquences d'oligonucléotides à façon.

## IV. COUPLAGE DE SPERMINES EN 3'

### A. Couplage de spermines sur support dT-CPG

#### 1. Choix du support

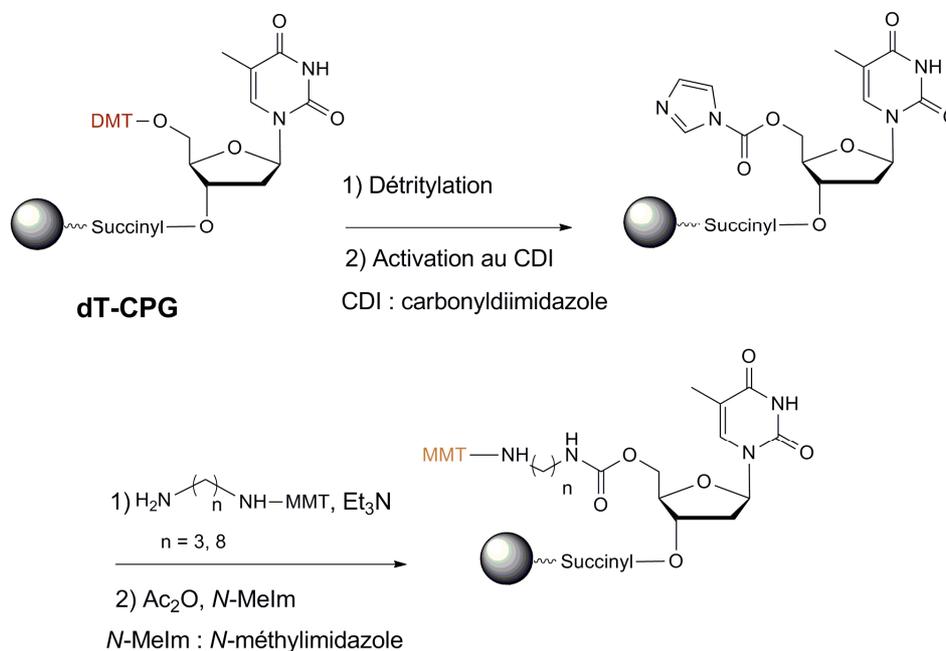
Plusieurs supports ont été testés pour le couplage du synthon **8**. Des essais préliminaires sur une résine Gly-Merrifield (Novabiochem, 260  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) présentant une fonction amine terminale montrent de très bons rendements de couplage moyen (83%), dans les conditions opératoires optimisées précédemment (cf. p.74). En effet, ce support a pour propriété de « gonfler » dans le dichlorométhane, rendant ainsi les sites réactifs plus accessibles. En revanche, il est inadapté à la synthèse d'oligonucléotides [231], sans doute parce que la résine a tendance à se « rétracter » en présence d'acétonitrile, empêchant une bonne réaction des phosphoramidites avec le support.

La dT-CPG est une résine classique très utilisée pour la synthèse d'oligonucléotides et paraît donc plus appropriée pour notre synthèse. Habituellement, ce support a une charge comprise entre 35  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  et 50  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  et possède une fonction alcool terminale protégée par un groupement DMT. Il va donc falloir modifier cette résine de façon à introduire une fonction amine.

## 2. Introduction de la fonction amine

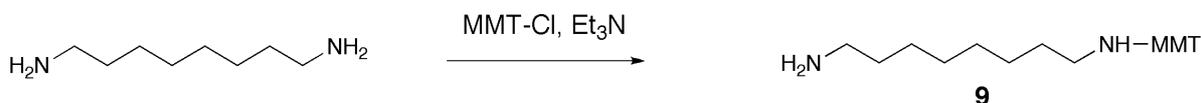
### a. Support dT-CPG à l'échelle d'1 $\mu\text{mol}$

Les essais préliminaires d'introduction d'une fonction amine sur support dT-CPG ont été effectués à l'aide d'une colonne d'1  $\mu\text{mol}$  (1 éq.). Après détritulation et activation à l'aide de CDI (200 éq.) en milieu anhydre, une diamine (120 éq.) est couplée au support (Figure 64) en présence de triéthylamine (120 éq.).



**Figure 64 : Introduction d'une fonction amine sur le support dT-CPG**

La première diamine testée était le 1,3-diaminopropane, mais dans le souci d'augmenter la disponibilité des sites réactifs, ce lien a rapidement été remplacé par le 1,8-diaminooctane. Toutefois, il n'y a pas eu d'amélioration sensible du rendement par cet échange. Par la suite, il a semblé préférable de protéger une des amines de cette molécule par un groupement MMT, ce qui a abouti à la synthèse de l'amine **9** (Figure 65).



**Figure 65 : Synthèse de la diamine mono-protégée 9**

Ce groupement MMT permet d'une part de protéger les amines lors de l'étape de cap des fonctions alcools par de l'anhydride acétique (Figure 64), et d'autre part, d'évaluer le rendement de couplage pour cette étape de la synthèse. Bien que d'autres réactifs de cap aient été testés, il paraît évident que l'anhydride acétique en présence de *N*-méthylimidazole (cap Mix A et cap Mix B) est parfaitement indiqué dans ce cas, puisqu'il s'agit de réactifs traditionnellement utilisés en synthèse d'oligonucléotides, en présence de ce type de support. Après capping, la résine est détritylée. Le rendement de l'étape d'incorporation de la fonction amine, pour cette échelle de réaction, est compris entre 75% et 80%. Une autre méthode de modification du support a été envisagée, mettant en jeu une activation des sites alcools de la résine à l'aide de *p*-nitrophényl chloroformiate (130 éq.), en présence de pyridine. Le nitrophénol généré par réaction avec la diamino-octane **9** peut également être dosé et conforter la mesure du MMT. Toutefois, le rendement de cette réaction (32%) n'est pas aussi élevé que par activation au CDI, ce qui est confirmé par la littérature [232] et justifie l'abandon de cette démarche.

#### **b. Support dT-CPG à grosse échelle (20 $\mu$ mol)**

Transposer la réaction d'introduction de la fonction amine sur support dT-CPG d'une échelle d'1  $\mu$ mol à 20  $\mu$ mol nécessite un certain nombre de modifications des protocoles expérimentaux. Les manipulations ne se font plus en percolant une solution aux travers d'une colonne d'oligonucléotide à l'aide de deux seringues, mais dans une colonne de 5 mL mise sur plaque d'agitation. Le volume de réactif n'est plus imposé par le volume interne de la colonne comme c'est le cas par percolation et peut donc être réduit, ainsi que le nombre d'équivalents nécessaires pour la réaction. Pour l'introduction de la fonction amine, le nombre d'équivalents en CDI puis en diamine et triéthylamine est ainsi divisé environ par 2 par rapport aux expériences à l'échelle d'1  $\mu$ mol (respectivement 100 éq., 65 éq. et 80 éq.). En allongeant le temps de réaction à 22 h 30, le rendement de couplage s'élève alors à 97,5%.

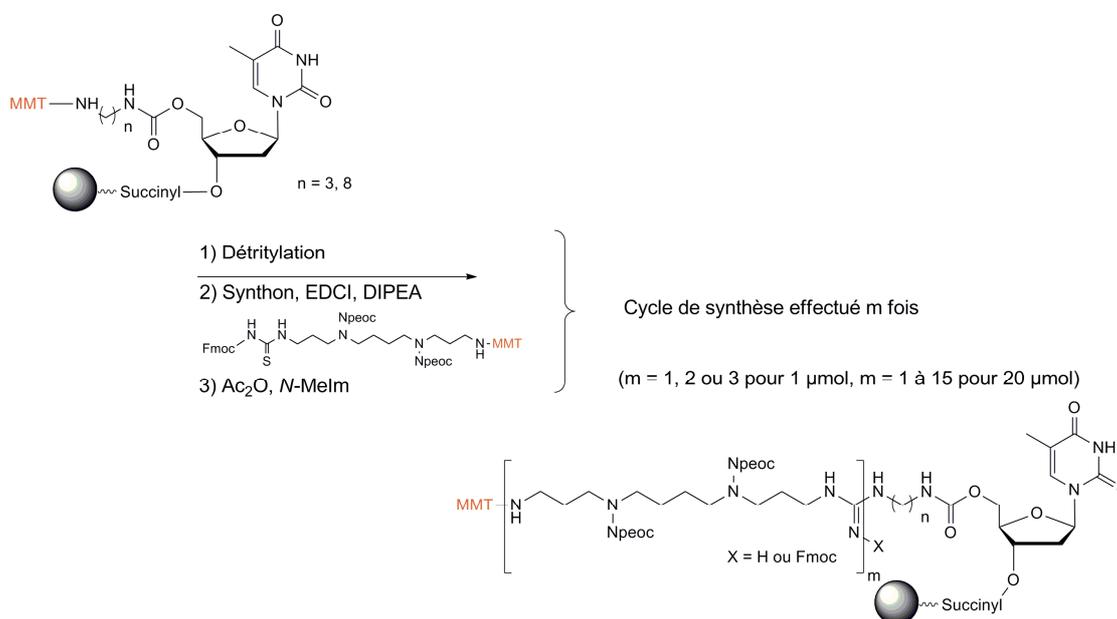
3. Couplage de la spermine **8**

Figure 66 : Cycle de synthèse de guanidinospermines sur support dT-CPG aminomodifié

## a. Support dT-CPG à l'échelle d'1 µmol

À l'aide des enseignements tirés de l'expérience de couplage de guanidinospermines en 5', les mêmes paramètres de réaction ont été retenus, c'est-à-dire le DCM en tant que solvant, l'EDCI en tant qu'activateur et la DIPEA en tant que base. Toutefois, le volume de solution à percoler sur la colonne et donc le nombre d'équivalents par rapport au support dT-CPG ont pu être encore réduits d'un tiers soit un volume de 220 µL, pour une consommation en thionurée **8** de 20 µmol. Le nombre d'équivalents en activateur par rapport à la thionurée **8** a en revanche été augmenté (4,4 éq. contre 2,2 éq.) afin d'assurer une meilleure activation de la thionurée. Le thionurée spermine **8** est donc couplé au support dT-CPG amino-modifié en 4 h avec des rendements de couplage compris entre 70% et 88%, avec un rendement moyen de couplage de 80%. Ces rendements de couplage montrent une nette amélioration par rapport aux couplages effectués en 5' (cf p.80).

Après couplage, les fonctions amines n'ayant pas réagi sont bloquées avec un réactif de cap (Figure 66). Plusieurs essais ont été réalisés pour trouver le cap adéquat, en employant soit une solution de chlorure de Fmoc dans du DCM en présence de *N*-méthylimidazole (250 µL, 100 éq. / 200 éq.) percolée pendant 2 h, soit une solution de carbonate **4** (cf. Figure 46) dans

du DCM, en présence de DMAP (250  $\mu\text{L}$ , 100  $\text{éq.}$  / 100  $\text{éq.}$ ) pendant 2h, soit un mélange d'anhydride acétique (cap Mix A) et de *N*-méthylimidazole (Cap Mix B) pour des temps variant entre 3 min et 30 min. Les résultats obtenus ne permettant pas de conclure clairement quant à l'efficacité relative de ces différents réactifs, c'est la dernière méthode de cap qui a été retenue pour la synthèse de guanidospermines en 3' à l'échelle de 20  $\mu\text{mol}$ . Après l'étape de cap, le groupement MMT terminal peut être conservé pour purification, ou détritillé (16 min) pour couplage additionnel de spermines. À l'échelle d'1  $\mu\text{mol}$ , jusqu'à 3 spermines ont été couplées avec succès au support, selon ce protocole.

#### **b. Support dT-CPG à grosse échelle (20 $\mu\text{mol}$ )**

Tout comme pour l'introduction de la fonction amine sur le support, le passage d'une échelle d'1  $\mu\text{mol}$  à l'échelle de 20  $\mu\text{mol}$  en support dT-CPG (42  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) permet de réduire l'excès de réactifs nécessaire au couplage. Ainsi la quantité de synthon spermine **8** est réduite à 8  $\text{éq.}$  par rapport à la fonction amine portée par la résine contre 20  $\text{éq.}$  précédemment. L'excès d'activateur (EDCI) et de base (DIPEA) par rapport à l'amine portée par le support est diminué de 50%. Le couplage est effectué dans ces conditions en 24 h et on évalue le rendement sur quelques milligrammes de résine par déprotection du groupement MMT. Si ce rendement est insuffisant, l'étape de couplage est répétée. Après réaction, les sites n'ayant pas réagi sont bloqués à l'aide d'anhydride acétique en présence de *N*-méthylimidazole pendant 30 min. Au total, jusqu'à 12 spermines ont été couplées au support, avec des rendements compris entre 80% et 100% (95% en moyenne) pour une charge finale en résine évaluée à 23,5  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ .

### **4. Synthèse de l'oligonucléotide**

Le décacatène ADN de séquence 5'-GCGATGCCAC-3' (cf paragraphe III.A de ce chapitre) est synthétisé directement sur des supports comprenant 1, 2 ou 3 guanidospermines (0,5-1  $\mu\text{mol}$ ) par un lien phosphoramidate. Cette liaison phosphoramidate, évoquée au chapitre 1 (p.40) est connue pour être relativement stable aux bases [110] et peut donc supporter les conditions de déprotection de l'oligonucléotide. Afin d'optimiser le couplage du premier nucléotide sur la fonction amine, le temps de réaction est augmenté à 15 min, avec une double quantité de réactif phosphoramidite par rapport aux conditions courantes de synthèse d'oligonucléotides. Le reste de la séquence est synthétisé selon un cycle classique de

synthèse, en utilisant des phosphoramidites ADN standards. La synthèse est effectuée de façon à conserver le groupement DMT final.

## 5. Déprotection et purification de l'oligonucléotide

### a. Déprotection de l'oligonucléotide

Deux méthodes ont été utilisées pour déprotéger l'oligonucléotide. La première méthode (Figure 67, méthode n°1) consiste à déprotéger en premier lieu les groupements Npeoc, Fmoc et cyanoéthyles par une solution de DBU 1 M dans l'acétonitrile par percolation au travers la colonne pendant 4 h puis à déprotéger les bases et décrocher l'oligonucléotide du support par traitement avec une solution d'ammoniac 28% pendant 24 h à température ambiante. L'autre méthode (Figure 67, méthode n°2) consiste à d'abord décrocher l'oligonucléotide du support et déprotéger les bases à l'aide d'ammoniac concentré pendant 24 h, puis à lyophiliser l'oligonucléotide brut ainsi obtenu et le suspendre dans une solution de DBU 1M en chauffant à 55°C pendant une nuit puis en laissant à température ambiante pendant 48 h.

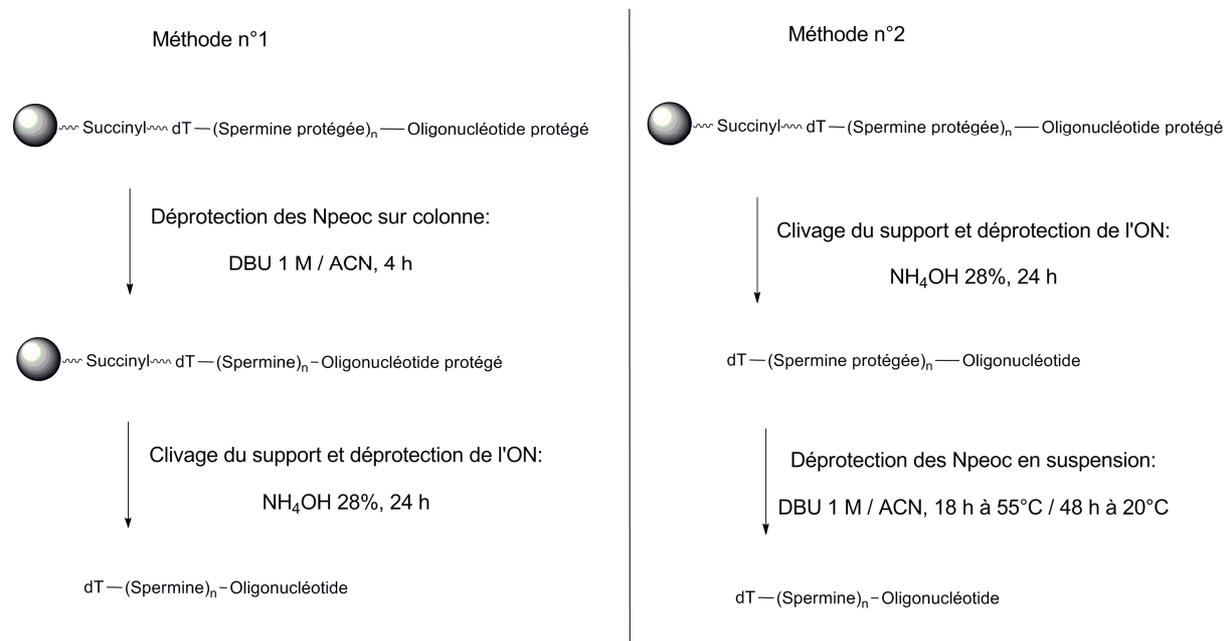
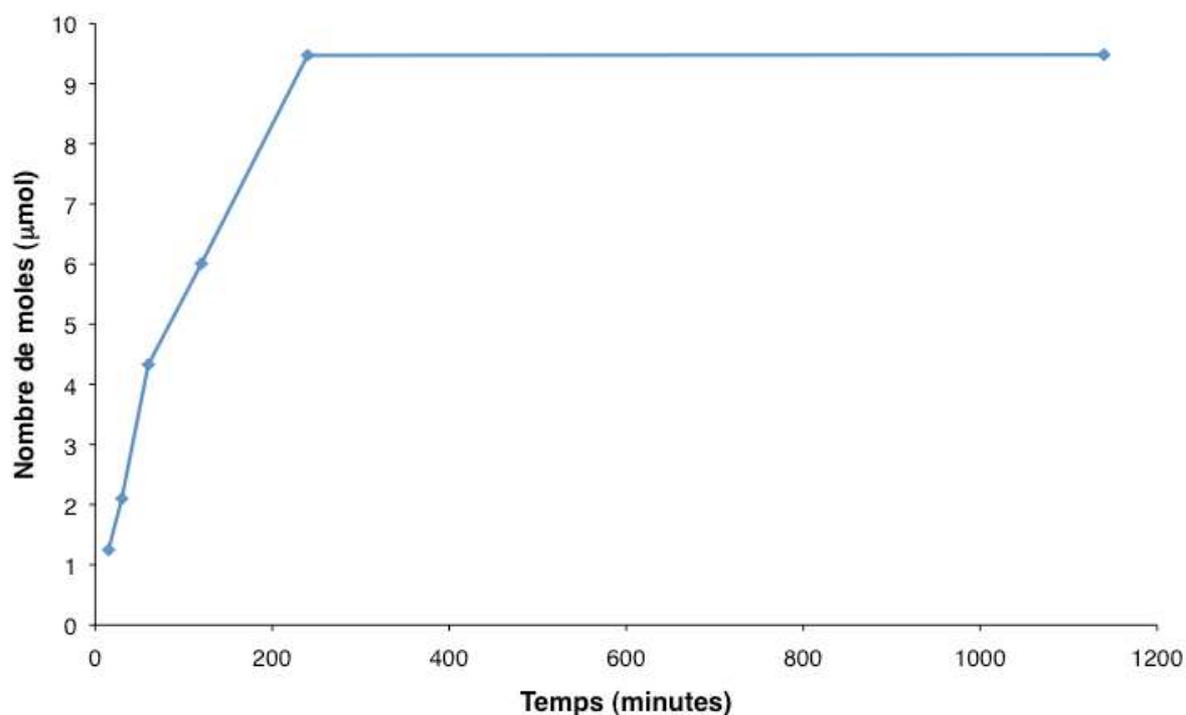


Figure 67 : Méthodes de déprotection de l'oligonucléotide-guanidinospermine(s)

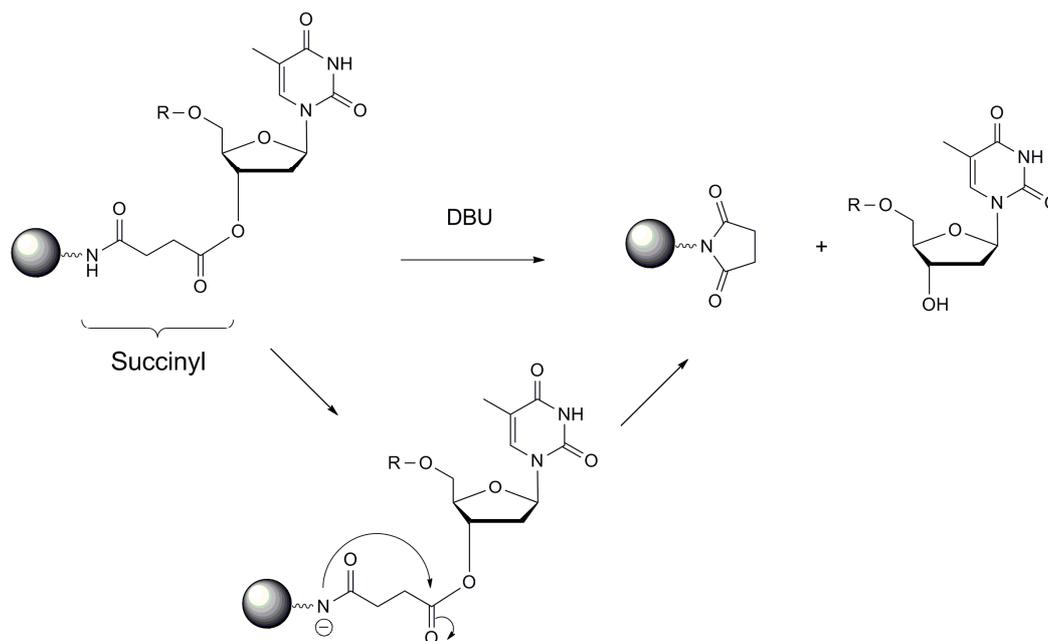
Les deux méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients. La première méthode, plus usitée, permet de s'affranchir du DBU et du nitrostyrène après déprotection par simples lavages de la colonne. Toutefois, contrairement à ce qui a été observé en solution où

la déprotection des Npeoc est effectuée en moins de 2 h (cf. p.67), un, voire deux résidus Npeoc (M+194, M+388) sont parfois présents sur l'oligonucléotide et observés en spectrométrie de masse MALDI-TOF même après 4 h de déprotection. Sur le même principe qu'en solution, un suivi de déprotection des groupements Npeoc sur support solide (10  $\mu\text{mol}$  environ) a donc été effectué pour évaluer le temps nécessaire à la déprotection (Figure 68).



**Figure 68 : Déprotection des groupements Npeoc sur support solide**

Les résultats montrent que la déprotection devrait être quasi-totale à t+4 h. Cependant, en conjuguant ces résultats à ceux observés par spectrométrie de masse, le temps de réaction a été augmenté à 8 h. D'autre part, nous avons constaté que le traitement par une solution de DBU 1 M sur colonne aboutissait en 4 h au décrochage d'environ un tiers de la quantité d'oligonucléotide initialement présente, même en conditions anhydres. Ces observations ont été confortées par des résultats similaires rapportés dans la littérature [224, 233, 234]. Le mécanisme de décrochage par cette solution de DBU est donné en Figure 69. DBU étant une base forte non nucléophile, l'azote en  $\alpha$  du lien succinyl est déprotoné, aboutissant à une perte substantielle en oligonucléotide par un mécanisme de cyclisation à cinq atomes.



**Figure 69 : Décrochage de l'oligonucléotide du support par une solution de DBU**

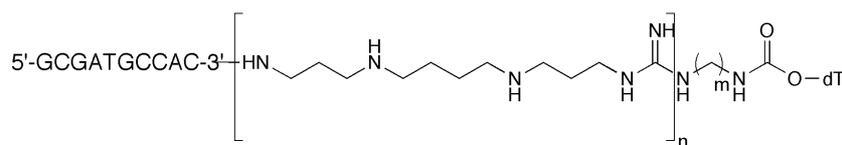
Pour cette raison, la deuxième méthode de déprotection des oligonucléotides conjugués à des guanidinospermines a été développée et a permis d'obtenir des oligonucléotides  $[N]_{10}GS_1$ ,  $[N]_{10}GS_2$  et  $[N]_{10}GS_3$ . Toutefois la déprotection des Npeoc se fait en phase hétérogène puisque l'oligonucléotide n'est pas soluble dans l'acétonitrile. Il n'est alors plus possible d'effectuer un dosage du nitrostyrène résultant pour déterminer le temps nécessaire à l'achèvement de la réaction. L'élimination des groupements Npeoc en phase hétérogène étant supposée plus difficile qu'en solution, les temps de déprotection sont augmentés. D'autre part, la purification ultérieure des oligonucléotides sur cartouche Polypak II ne permet pas d'éliminer complètement le DBU et autres impuretés. Un voire plusieurs dessalage(s) sont alors nécessaires pour s'affranchir de ce problème.

### **b. Purification des oligonucléotides conjugués à des guanidinospermines**

La purification des oligonucléotides a été effectuée par cartouche Polypak II et/ou par HPLC.

## **6. Résultats obtenus et améliorations potentielles**

Le couplage de spermines en 3' a permis d'obtenir plusieurs oligonucléotides conjugués  $[N]_{10}GS_1$ ,  $[N]_{10}GS_2$  et  $[N]_{10}GS_3$ , caractérisés par spectrométrie de masse (Tableau 5). Les propriétés de ces conjugués ont pu être étudiées et seront décrites plus loin (cf. p.103).



Oligonucléotide	Nombre de spermines (n)	Longueur de la chaîne carbonée (m)	M (g.mol <sup>-1</sup> )	M <sub>observée</sub>
[N] <sub>10</sub> GS <sub>1</sub>	1	3	3644,6	3644,6 <sup>a</sup>
[N] <sub>10</sub> GS <sub>3</sub>	3	3	4099,3	4098,3 <sup>b</sup>
[N] <sub>10</sub> GS <sub>1</sub>	1	8	3714,8	3715,1 <sup>a</sup>
[N] <sub>10</sub> GS <sub>2</sub>	2	8	3942,1	3941,6 <sup>a</sup>
[N] <sub>10</sub> GS <sub>3</sub>	3	8	4169,5	4168,8 <sup>a</sup>

Tableau 5 : Caractérisation des composés GS<sub>n</sub>[N]<sub>10</sub> (n = 1, 2 ou 3).

a : MALDI-TOF, b : ESI

Cependant, le support dT-CPG utilisé pour la synthèse comporte un lien succinyl partiellement clivable lors du traitement par DBU directement sur colonne, ce qui entraîne un décrochage prématuré de l'oligonucléotide du support. Bien qu'il soit possible de contrecarrer ce problème en modifiant le protocole de déprotection par DBU, cette nouvelle méthode ne permet pas d'évaluer le temps nécessaire à l'achèvement de la réaction, et surtout nécessite un dessalage supplémentaire pour éliminer le DBU et autres impuretés résiduelles. Un moyen simple d'éviter ce problème consiste à modifier un support de façon à avoir un lien clivable sarcosyl-succinyl résistant aux conditions de déprotection par DBU (Figure 70) [224, 233]. C'est ce nouveau type de support qui est développé dans le paragraphe suivant (cf.p.93).

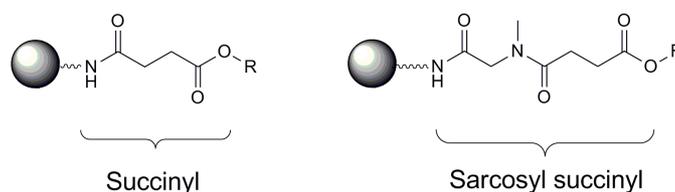


Figure 70 : Support sarcosyl-succinyl

D'autre part, le lien phosphoramidate utilisé jusqu'à présent comme lien entre les spermines et l'oligonucléotide est bien résistant aux conditions basiques, néanmoins sa faible stabilité aux conditions acides [110] peut s'avérer problématique. De façon récurrente, on observe sur

les spectres de masses la présence d'un pic correspondant à l'oligonucléotide seul, qui n'est lié ni aux spermines, ni à la base dT du support utilisé. Il résulte donc bien d'un clivage du lien phosphoramidate. Ce clivage partiel peut éventuellement se produire lors de l'étape de détritulation lors de la purification. Cependant l'analyse des spectres HPLC ne montre pas de pic correspondant à l'oligonucléotide seul. Cette séparation des spermines du décamère peut aussi survenir tout simplement lors de la préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse MALDI, puisque l'analyse se fait en présence d'acide 3-hydroxypicolinique ou lors de l'ionisation. Pour ces raisons, une nouvelle molécule de liaison a été développée (cf. p.95) : l'alcool protégé **12**, pour incorporer une fonction hydroxyle à l'extrémité 5' des guanidino-spermines. Le lien entre les spermines et l'oligonucléotide sera alors un groupement phosphate classique.

## B. Couplage de spermines sur support sarcosyl-succinyl-CPG

### 1. Synthèse du support sarcosyl-succinyl-CPG

#### a. Couplage de la sarcosine sur lcaa-CPG

Afin d'introduire un lien succinyl-sarcosyl, un support lcaa-CPG (taille des pores : 500 Å, charge : 130  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ), présentant des fonctions amines terminales, est d'abord activé 24 h dans une solution de TCA à 5% dans du DCM [235]. La résine est ensuite modifiée par couplage d'un petit acide aminé modifié de la glycine, la sarcosine, protégée par un groupement Fmoc, en présence d'un activateur, le DIC et d'une base, la pyridine (Figure 71).

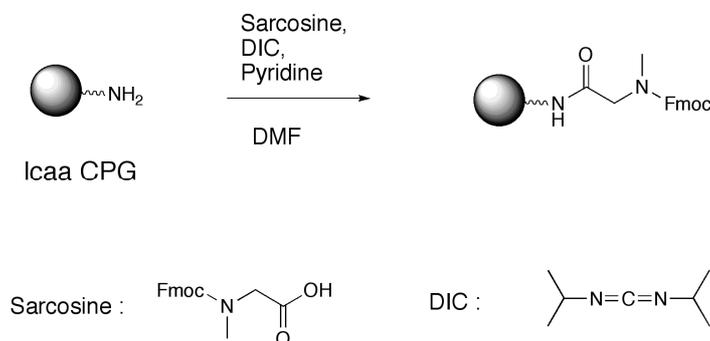


Figure 71 : Couplage de la sarcosine sur lcaa-CPG

Le DIC est un activateur très utilisé pour le couplage peptidique. Il présente l'avantage, contrairement à son homologue DCC, de générer comme produit secondaire une urée soluble dans les solvants organiques, et donc facile à séparer du support solide après réaction. Le rendement de la réaction, après double couplage d'une durée de 40 h, est de 97,5% ( $127 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ). L'estimation du rendement s'effectue sur quelques milligrammes, par déprotection des groupements Fmoc présents sur les fonctions amines de la sarcosine par de la pipéridine 20% dans du DMF et dosage du méthylènefluorène résultant à 300 nm ( $\epsilon_{300} = 7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [236]. Lorsque le rendement paraît satisfaisant, la résine est alors déprotégée 45 min par une solution de pipéridine 10% dans la pyridine.

### b. Couplage du lien succinyl sur sarcosyl-lcaa-CPG

Afin d'insérer un lien succinyl sur la sarcosyl-lcaa-CPG, le succinate **10** est synthétisé à partir de Fmoc-aminohexanol et d'anhydride succinique en présence de pyridine (Figure 72).

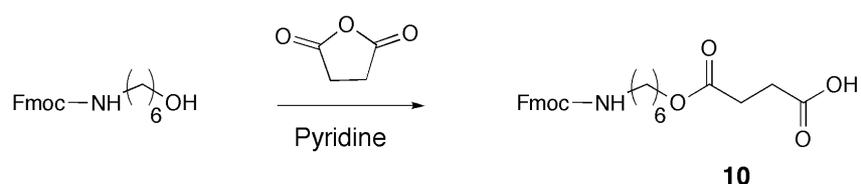


Figure 72 : Synthèse du succinate **10**

Ce succinate **10** permet incorporer directement une fonction amine pour couplage avec le synthon spermine **8**. Comme pour le couplage de la sarcosine, l'évaluation du rendement est une nouvelle fois possible grâce au groupement protecteur Fmoc porté par cette fonction amine. Le couplage du succinate **10** sur la sarcosyl-lcaa-CPG s'effectue de la même façon que pour le couplage de la sarcosine, en présence de DIC et de pyridine pendant 40 h.

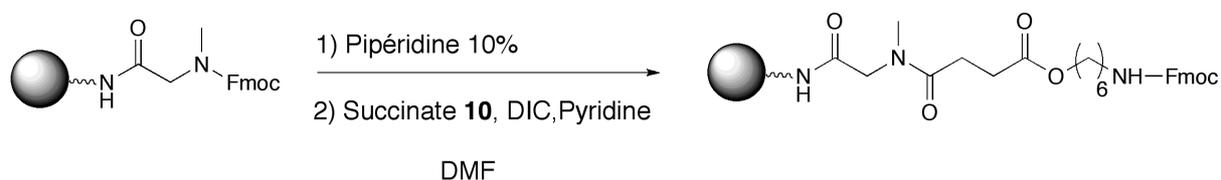


Figure 73 : Couplage du succinate **10** sur support sarcosyl

Le rendement de couplage est alors de 95% ( $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ). Après réaction, le groupement Fmoc est déprotégé en 45 min par une solution de pipéridine 10% dans la pyridine.

## 2. Couplage de la spermine **8** sur aminohexyl-succinyl-sarcosyl-lcaa-CPG

### a. Validation du support par couplage d'une thiourée modèle **12**

Le support sarcosyl-succinyl-CPG ( $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ) présente une charge initiale en fonctions amines environ trois à quatre fois plus élevée que les supports précédemment décrits. Afin d'évaluer si le couplage d'une fonction thiourée sur un support présentant une telle densité de sites réactifs est toujours réalisable, la thiourée **12** (Figure 74) est utilisée comme modèle pour la réaction. Initialement, cette molécule a été développée pour introduire une fonction alcool après couplage des spermines, de manière à éviter la formation d'un lien phosphoramidate et pouvoir ainsi utiliser des conditions classiques de synthèse lors du couplage du premier nucléotide. La thiourée **12** est obtenue en deux étapes : l'insertion de la fonction thiourée à l'aide de Fmoc-isothiocyanate (70%) puis la protection de la fonction alcool à l'aide du groupement DMT (63%) (Figure 74).

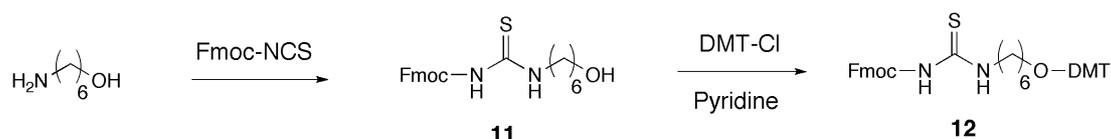


Figure 74 : Synthèse de la molécule de liaison **12**

Le couplage de la molécule **12** avec le support s'effectue dans les mêmes conditions que pour couplage du synthon **8**, en présence d'EDCI et de DIPEA pendant une nuit (Figure 75).

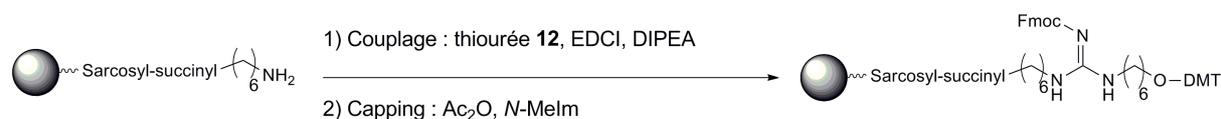


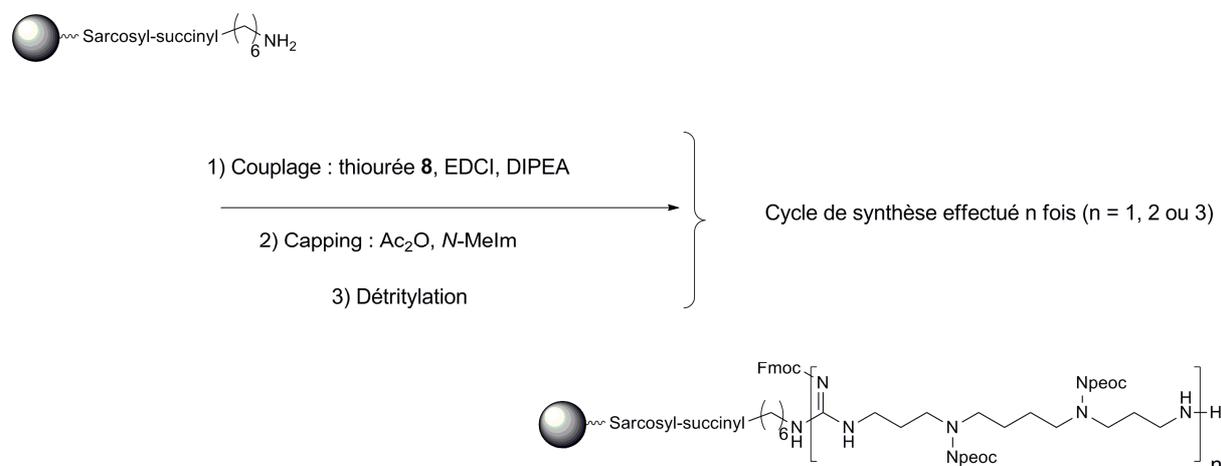
Figure 75 : Test de couplage de la thiourée **12** sur le support sarcosyl-succinyl

Le rendement estimé par déprotection du groupement DMT s'élève à 93% ( $111 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ) et valide l'utilisation de ce support pour le couplage des spermines.

### b. Couplage de la spermine **8** sur support aminohexylsuccinyl-sarcosyl-CPG

La thiourée **8** est couplée en 24 h sur la résine aminohexylsuccinyl-sarcosyl-lcaa-CPG dans les mêmes conditions que pour le support dT-CPG (cf. p.86), en présence d'EDCI et de

DIPEA (Figure 76). Jusqu'à trois guanidospermines ont ainsi été oligomérisées sur ce nouveau support. Par la suite, ces supports seront dénommés GS<sub>1</sub>, GS<sub>2</sub> ou GS<sub>3</sub>.



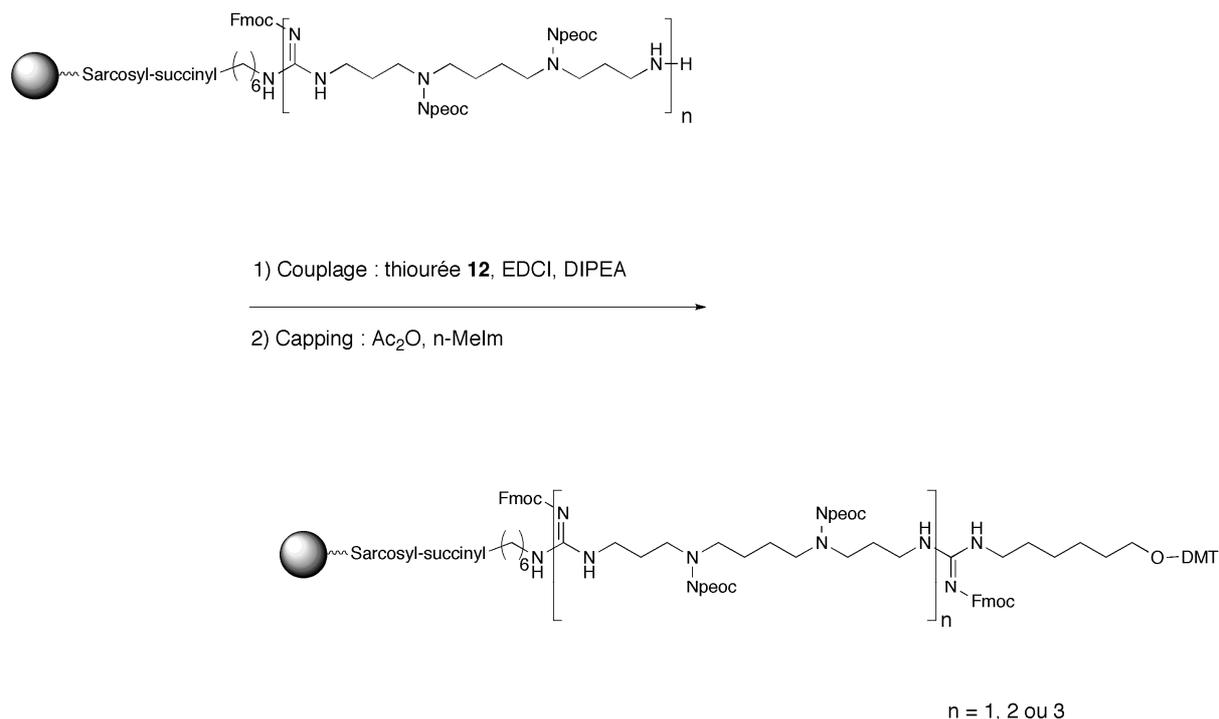
**Figure 76 : Synthèse des supports GS<sub>1</sub>, GS<sub>2</sub> et GS<sub>3</sub>**

Le rendement de couplage de la première spermine étant insatisfaisant à ce stade (62%), un double couplage a donc été effectué, mais ne permet pas d'augmenter suffisamment ce résultat (86  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ , 72%). Comme précédemment, ce rendement est estimé par détritylation de quelques milligrammes de résine. Après réaction, l'étape de cap par de l'anhydride acétique en présence de *N*-méthylimidazole est augmentée à 2 h contre 30 min sur support dT-CPG, afin de s'assurer un blocage efficace de tous les sites réactifs résiduels. La résine est ensuite détritylée pour couplage(s) supplémentaire(s). Le couplage d'une deuxième spermine est effectué avec un rendement de 78% (67,5  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ), celui d'une troisième spermine avec un rendement de 81% (55  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ), en réalisant à chaque fois des doubles couplages pour augmenter le rendement. Ces résultats sont inférieurs à ceux observés pour le simple couplage de la molécule **12**, alors que la fonction thiourée mise en jeu est exactement la même. Ceci s'explique peut-être par la présence des groupements protecteurs Npeoc sur le synthon spermine **8** qui génère un certain encombrement stérique et une flexibilité de la chaîne carbonée réduite par rapport à la thiourée **12**. La diffusion de la molécule **8** et sa réactivité peuvent ainsi en être affectées.

### 3. Synthèse d'oligonucléotides

#### a. Introduction d'une fonction alcool

Après couplage de(s) spermine(s), la molécule de liaison **12** (Figure 74) est insérée sur le support, afin d'avoir une fonction hydroxyle terminale nécessaire à la création d'une liaison phosphate lors du couplage de l'oligonucléotide (Figure 77).

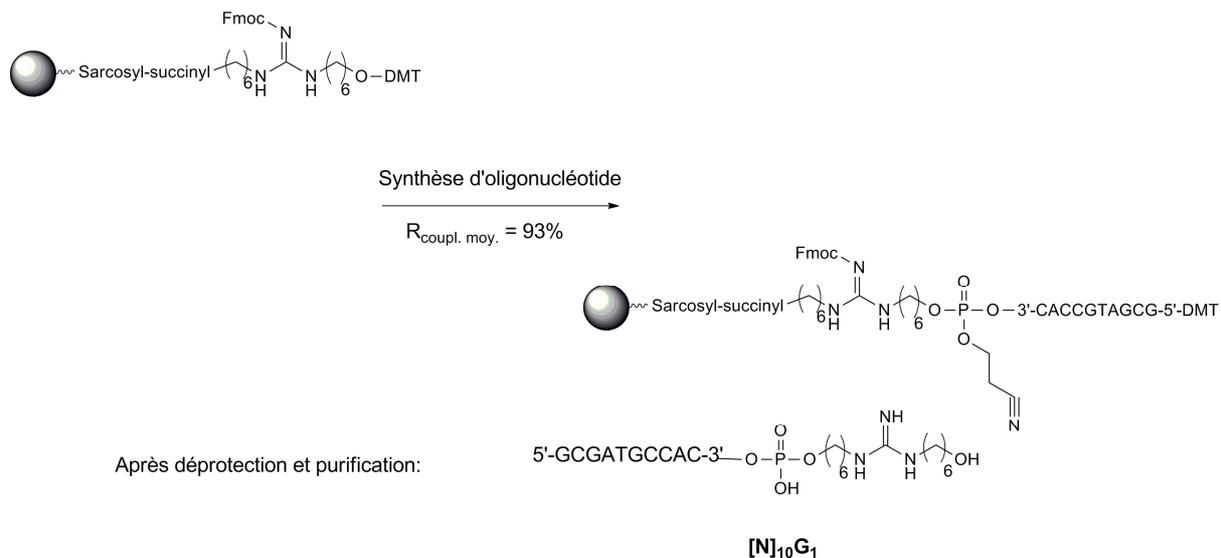


**Figure 77 : Insertion de la fonction alcool pour couplage de l'oligonucléotide**

La réaction de couplage et le capping sont réalisés exactement dans les mêmes conditions que pour le couplage des spermines pour des rendements estimés à 90% en moyenne par dosage après détritulation du DMT.

#### b. Synthèse d'oligonucléotides

Un décimère de séquence 5'-GCGATGCCAC-3' déjà décrite est synthétisé dans un premier temps sur le support « modèle » (111 μmol.g<sup>-1</sup>, Figure 75) généré par réaction entre la aminohexylsuccinyl-sarcosyl-CPG avec la thiourée **12**. Ce décimère sera par la suite noté [N]<sub>10</sub>G<sub>1</sub> (Figure 78).



**Figure 78 : Synthèse de l'oligonucléotide "modèle" [N]<sub>10</sub>G<sub>1</sub>**

Cette synthèse est effectuée de façon standard, pour 1  $\mu\text{mol}$  de support introduit dans la colonne, en utilisant des phosphoramidites et réactifs classiques et en conservant le groupement DMT final. Les rendements de couplage moyen des nucléotides s'élèvent seulement à 93%, y compris en doublant le temps de réaction ainsi que les quantités de phosphoramidites et d'activateur. En revanche, lorsque la synthèse est effectuée sur un support GS<sub>1</sub> ( $76 \mu\text{mol.g}^{-1}$  après couplage de la molécule **12**, Figure 79), le rendement de couplage moyen est de 97%, cohérent avec ce qui est observé pour une synthèse d'ADN test. La différence entre les rendements de couplage moyen peut s'expliquer simplement par la charge initiale du support. Le support « modèle » ayant une charge de  $111 \mu\text{mol.g}^{-1}$  contre  $35 \mu\text{mol.g}^{-1}$  à  $50 \mu\text{mol.g}^{-1}$  en synthèse classique d'ADN, il y a deux à trois fois plus de sites réactifs. L'excès en phosphoramidite injecté se trouve ainsi réduit et la densité des sites réactifs engendre peut-être une gêne stérique, empêchant le bon déroulement de la réaction de couplage. Le support GS<sub>1</sub> ( $76 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ) présentant seulement 1,5 à 2 fois plus de sites réactifs, le rendement de couplage moyen reste acceptable, quoique dans la fourchette basse des rendements classiquement observés en synthèse d'ADN.

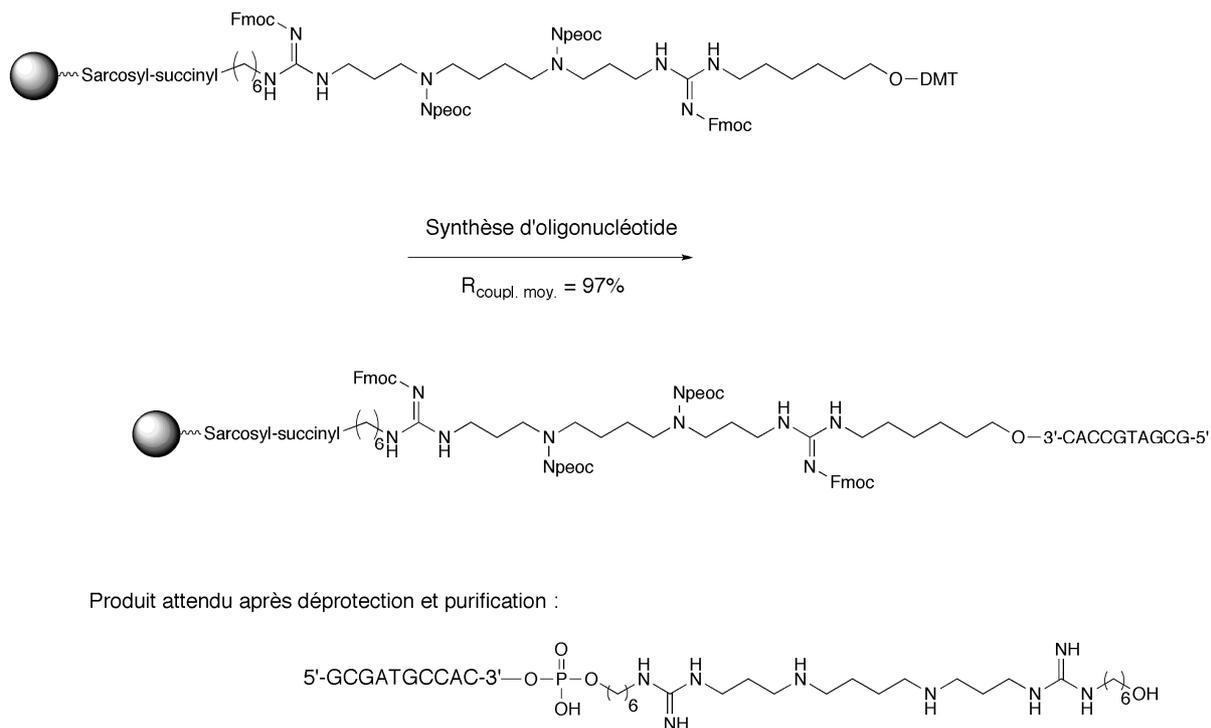


Figure 79 : Synthèse d'oligonucléotide sur support GS<sub>1</sub>

### c. Déprotection des groupements Npeoc, Fmoc et cyanoéthyles

Afin de s'assurer d'une déprotection complète des groupements Npeoc, les temps de traitement par une solution anhydre de DBU sont allongés. La déprotection des groupements Fmoc, Npeoc et cyanoéthyles est effectuée dans le noir pendant 19 h 30 jusqu'à 4 jours. La comparaison des spectres bruts t+19 h 30 et t+4 jours suggère que la déprotection des Npeoc est complète pour t+19 h 30.

### d. Évaluation du décrochage de l'oligonucléotide du support par DBU 1 M

Le support a été mis au point afin d'éviter le clivage prématuré de l'oligonucléotide lors du traitement par la solution de DBU 1 M. Pour garantir que ce nouveau support est bien adapté aux conditions de déprotection des Npeoc, la quantité d'oligonucléotide résiduelle dans la solution de déprotection est vérifiée à t+19 h 30. Cette évaluation, basée sur la détrylation du groupement DMT montre qu'il n'y a pas de clivage de l'oligonucléotide du support. Le support mis au point est donc parfaitement adapté à la déprotection sur colonne des groupements Npeoc par une solution anhydre de DBU 1 M dans l'acétonitrile

### e. Décrochage de l'oligonucléotide du support et déprotection des bases

La déprotection de l'oligonucléotide couplé à une spermine  $[N]_{10}GS_1$  ou à une guanidine  $[N]_{10}G_1$  s'effectue dans de l'ammoniac concentré pendant une nuit à 55°C, contrairement aux expériences précédentes où cette déprotection était effectuée à température ambiante. Cette modification du protocole s'explique par le fait que sur certains spectres de masse se retrouvait de façon récurrente une impureté correspondant à l'oligonucléotide guanidospermine(s) acétylé (M+43). Il est possible que ce produit corresponde à l'acétylation du (des) groupement(s) guanidine(s). Lors de la formation de la liaison, il est probable que les guanidines résultantes ne soient plus protégées par un groupement Fmoc [219], et soient donc acétylées lors du processus de cap. Le changement de protocole se justifie par le fait que Bruice et coll. rapportent que la présence d'un groupement acétyle sur le groupement guanidine nécessite un traitement prolongé dans l'ammoniac concentré, en chauffant à 55-60°C [123, 237].

### f. Résultats obtenus

Le composé  $[N]_{10}G_1$  est purifié sur une colonne Glen-Pak DNA, similaire aux cartouches PolyPak évoquées précédemment, puis analysé en HPLC. Le produit obtenu est pur à plus de 92% (Figure 80), bien que le rendement de couplage moyen des nucléotides ait été mauvais (93%) pour les raisons expliquées p. 96.

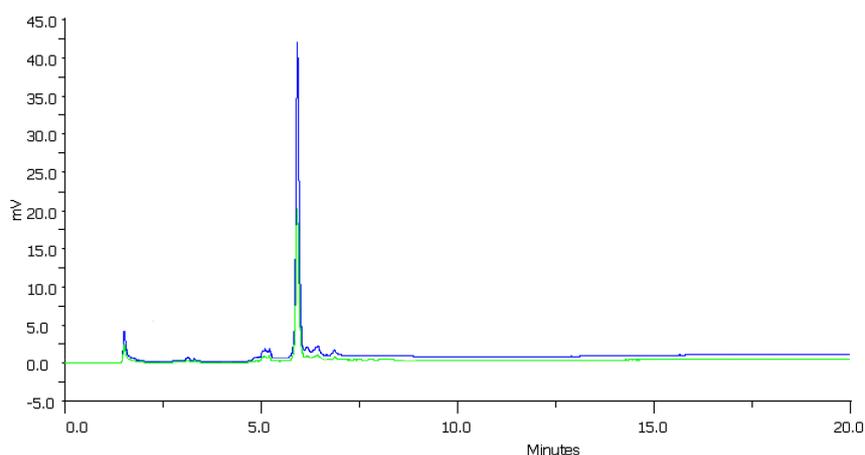


Figure 80 : Spectre HPLC du produit  $[N]_{10}G_1$

Ceci suggère que le support utilisé a été correctement modifié et que le cap  $Ac_2O$  utilisé pour bloquer les amines n'ayant pas réagi est suffisamment efficace.

En revanche, le produit  $[N]_{10}GS_1$  brut montre par analyse HPLC deux pics majoritaires. Un essai de purification par HPLC permet d'isoler le pic ayant le temps de rétention le plus court,



La synthèse s'effectuant sur support solide, il est difficile de déterminer à quelle étape se sont formés ces produits cyclisés. L'analyse des spectres de masse obtenus précédemment ne montre pas la présence de tels produits, ou alors de façon extrêmement minoritaire. Il est possible que cette cyclisation ait eu lieu pendant le clivage et la déprotection des oligonucléotides en milieu ammoniacué. Effectivement, alors que précédemment, cette étape était réalisée à température ambiante, on a, cette fois-ci, durci les conditions de déprotection en chauffant à 55°C. D'autre part, la présence supposée du groupement acétyle, électro-attracteur, sur les groupements guanidine aurait alors pour conséquence de faciliter cette réaction de cyclisation.

En conclusion, le nouveau support a été validé par une molécule modèle **12**, est correctement cappé, s'avère résistant aux conditions de déprotection par une solution de DBU. Une fonction alcool a par ailleurs été introduite avec succès (R = 90%) sur les guanidinospermines via la molécule de liaison **12** pour couplage ultérieur à un oligonucléotide. Toutefois, l'isolation par HPLC d'un sous-produit majoritaire correspondant probablement à une cyclisation des groupements guanidines pose problème. Plusieurs tests peuvent être effectués pour y circonvier : rechercher un réactif de cap plus labile dans les conditions de déprotection (ex : Pac<sub>2</sub>O), remplacer le groupement Fmoc présent sur la thiourée par un groupement Npeoc, qui sera donc déprotégé par la solution de DBU 1 M, tester des conditions de déprotection plus douces. Néanmoins, des essais préliminaires menés en ce sens n'ont pas donné de résultats satisfaisants. D'autre part, les résultats obtenus ci-après pour l'étude des propriétés de ces nouveaux conjugués oligonucléotides nous ont incité à nous concentrer davantage sur la synthèse et l'évaluation biologique des composés issus de la première génération d'oligonucléotides conjugués à des polyamines (évoqués p.51).

## V. CARACTERISATION DES OLIGONUCLEOTIDES CONJUGUES

### A. Caractérisation par spectrométrie de masse

Les oligonucléotides guanidino-spermines ont été caractérisés par spectrométrie de masse en utilisant deux méthodes d'ionisation : soit une ionisation par électronébuliseur (ESI), soit une désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Ces deux techniques d'ionisation,

douces, sont particulièrement adaptées à l'analyse de macromolécules car elles évitent leur fragmentation, contrairement à des méthodes d'ionisation plus conventionnelles. L'ionisation par électronébuliseur (Figure 82, source Wikipédia) consiste à transformer l'échantillon dissout en de fines gouttelettes chargées, à l'aide d'un capillaire fin soumis à un champ électrique (formation d'un cône dit « de Taylor »). Dans notre cas, le mode d'ionisation est négatif, l'échantillon est donc nébulisé, sous l'effet du champ électrique, sous forme de microgouttelettes chargées négativement. À l'aide d'un gradient de pression et de champ électrique entre le capillaire et l'analyseur, le nuage de gouttelettes est dirigé vers l'analyseur. Au cours de leur trajet, ces gouttelettes voient leur taille diminuer en raison de l'évaporation du solvant. Leur diamètre devient de plus en plus réduit alors que la densité de charge augmente, ce qui finit par engendrer une explosion coulombienne permettant la libération d'ions en phase gazeuse. Ce mode d'ionisation a été couplé à un analyseur Q-TOF (double quadripôle et analyseur à temps de vol).

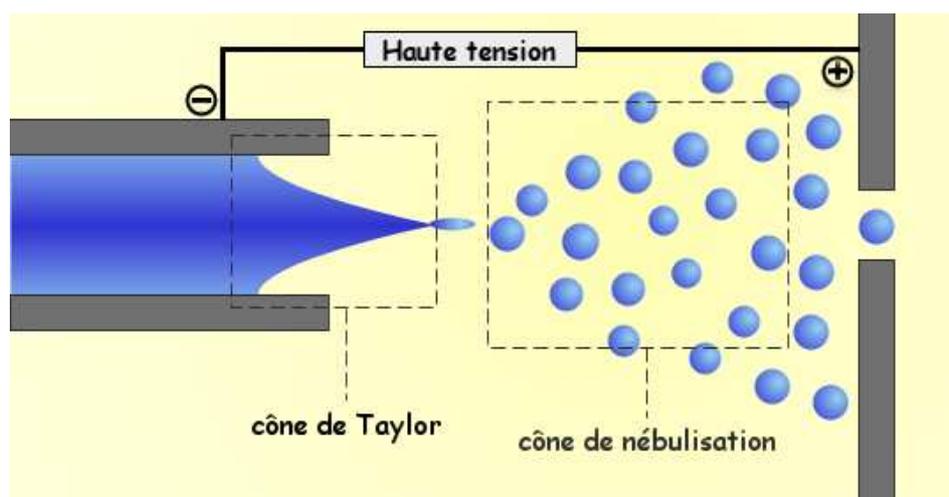


Figure 82 : Principe général d'ionisation par nébulisation

Toutefois, la source d'ionisation majoritairement privilégiée pour nos analyses est la désorption-ionisation laser assistée par matrice (Figure 83, source : Wikipédia) couplée à un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF). L'oligonucléotide est co-cristallisé à une matrice : l'acide 3-hydroxypicolinique (HPA) en présence de citrate de diammonium. La matrice permet de protéger l'échantillon de la destruction par un faisceau laser direct ainsi que de favoriser la vaporisation et l'ionisation. La matrice est ionisée en premier puis transfère sa charge à l'échantillon. L'analyse par temps de vol consiste à accélérer un ion par une tension connue et mesurer le temps que met cet ion à parcourir une certaine distance. Les ions les plus

lourds seront les moins accélérés. Ce temps est directement corrélable au rapport masse/charge.

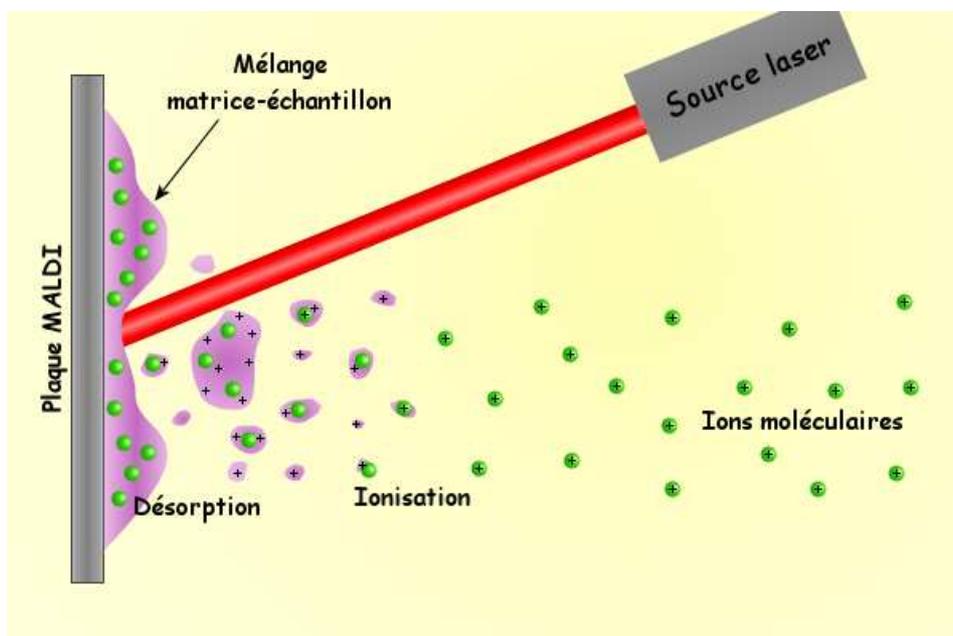


Figure 83 : Principe de désorption-ionisation assistée par matrice

## B. Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance

Les oligonucléotides conjugués ont été analysés par HPLC à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions haute résolution : une colonne Dionex DNA Pac 100 analytique. Cette colonne permet d'avoir une résolution au nucléotide près et est fonctionnalisée en surface avec des groupements amines quaternaires. Comme pour toute colonne échangeuse d'anions, les charges positives de surface vont retenir les entités chargées négativement alors que les molécules cationiques vont passer au travers de la colonne sans être retenues. Il y a alors deux méthodes pour éluer les composés retenus sur la résine : soit modifier le pH de la phase mobile de façon à ce que les molécules initialement chargées ne le soient plus, ou chargées de la même façon que la résine, soit ajouter un sel à concentration croissante. Le sel apporte un contre-ion de la résine qui va remplacer les molécules qui y sont fixées et permettre leur élution. Dans notre cas, nous avons choisi cette seconde méthode. Deux conditions d'analyse basées sur ce principe ont donc été utilisées : un gradient en solution de  $[\text{NaCl}] = 1 \text{ M}$  de 30%

à 100% en 20 min (dans  $[\text{NH}_4\text{OH}] = 0,1 \text{ M}$ ) ou bien un gradient en solution de  $[\text{KBr}] = 1,5\text{M}$  de 10% à 25% en 5 min puis 25% à 30% en 10 min (dans  $[\text{NaOH}] = 25 \text{ mM}$ ). Ce dernier gradient a également été utilisé pour la purification d'oligonucléotides sur colonne DNA Pac 100 semi-prep.

### C. Mesure des températures de fusion

Afin d'évaluer les propriétés de nos nouveaux conjugués oligonucléotides (décrits p.89), la stabilité des duplex formés avec un brin complémentaire sans spermine a été étudiée. On s'attend en effet à ce que la présence d'une chaîne cationique diminue la répulsion électrostatique entre les groupements phosphates des deux brins d'ADN, et par là même, améliore l'hybridation de ces deux brins. À basse température, deux brins d'ADN complémentaires sont naturellement hybridés grâce aux liaisons hydrogènes de Watson-Crick (cf. chapitre 1, p.7).

Lorsque l'on augmente la température, en revanche, ces interactions sont progressivement abolies jusqu'à désappariement total des deux brins d'ADN. L'hybridation ou la dénaturation étant des phénomènes coopératifs, il se trouve entre ces deux conditions, une situation intermédiaire où 50% des ADN doubles brins sont désappariés. La température correspondante à cet état, appelée température de fusion ( $T_m$ ), est utilisée pour caractériser la stabilité d'un duplex. Concrètement, plus l'hybridation d'un duplex sera forte, plus la  $T_m$  correspondante sera élevée. La détermination de cette  $T_m$  peut être réalisée par suivi de l'absorbance UV d'un duplex à 260 nm en faisant varier la température. En effet, les nucléotides sont connus pour avoir un maximum d'absorption en UV à 260 nm. L'empilement des bases dans la structure en double hélice de l'ADN a pour effet de diminuer cette absorbance par rapport aux nucléotides libres à la même concentration (phénomène d'hypochromicité). En conséquence, lorsque le duplex est hybridé, l'absorbance UV à 260 nm est minimale, et lorsqu'il se dénature, l'absorbance augmente jusqu'à atteindre un plateau correspondant à 100% de désappariement des brins (Figure 84-A). La température de fusion correspond alors au point d'inflexion de la courbe  $A_{260} = f(T^\circ\text{C})$  et peut être plus facilement déterminée sur la dérivée première  $d(A_{260})/d(T^\circ\text{C})$  comme étant l'abscisse du maximum de la courbe obtenue (Figure 84-B). On peut également la déterminer sur la courbe de la dérivée seconde  $d^2(A_{260})/d^2(T^\circ\text{C})$  comme étant l'abscisse pour  $y = 0$ .

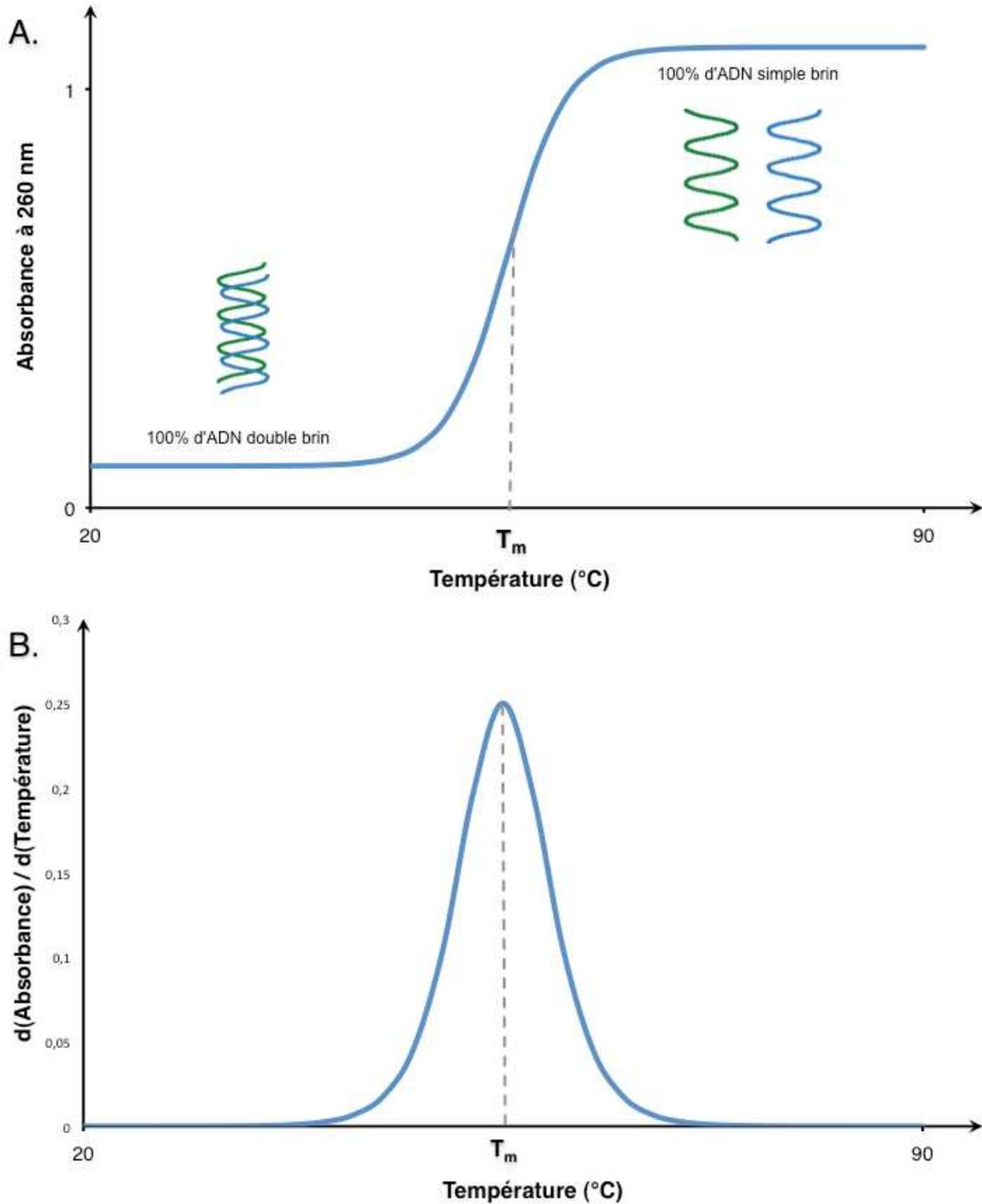


Figure 84 : Détermination de la température de fusion ( $T_m$ ) d'un ADN double brin

Les propriétés d'hybridation d'oligonucléotides conjugués à 1, 2 et 3 guanidospermines ( $[\text{N}]_{10}\text{GS}_1$ ,  $[\text{N}]_{10}\text{GS}_2$  et  $[\text{N}]_{10}\text{GS}_3$ ) en présence de leur brin complémentaire pour une concentration en duplex d'un micromolaire ont été étudiées dans un tampon HEPES 10 mM en présence de  $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$ . Une force ionique de 150 mM correspond à peu près aux

conditions salines physiologiques. Les échantillons ont été soumis à une montée en température de 20°C à 90°C à raison de 0,7°C/min. Le duplex obtenu par hybridation entre le décamère 5'-GCGATGCCAC-3' et son brin complémentaire est noté ODN. Afin de vérifier l'intérêt de nos composés par rapport aux conjugués oligonucléotides-oligospermines développés précédemment, les  $T_m$  des composés S<sub>1</sub>-ODN, S<sub>2</sub>-ODN et S<sub>3</sub>-ODN ont été étudiées conjointement. La stabilité des duplex contenant des guanidinospermines a également été comparée à celle d'un duplex de même séquence, sans spermine.

Oligonucléotide	$T_m$ ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ )	$\Delta T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )
ODN-GS <sub>1</sub>	49,3	2,9
ODN-GS <sub>2</sub>	48,3	1,9
ODN-GS <sub>3</sub>	50,4	4
Duplex témoin	46,4	-
S <sub>1</sub> -ODN	48,1	1,7
S <sub>2</sub> -ODN	49,3	2,9
S <sub>3</sub> -ODN	53,3	6,9

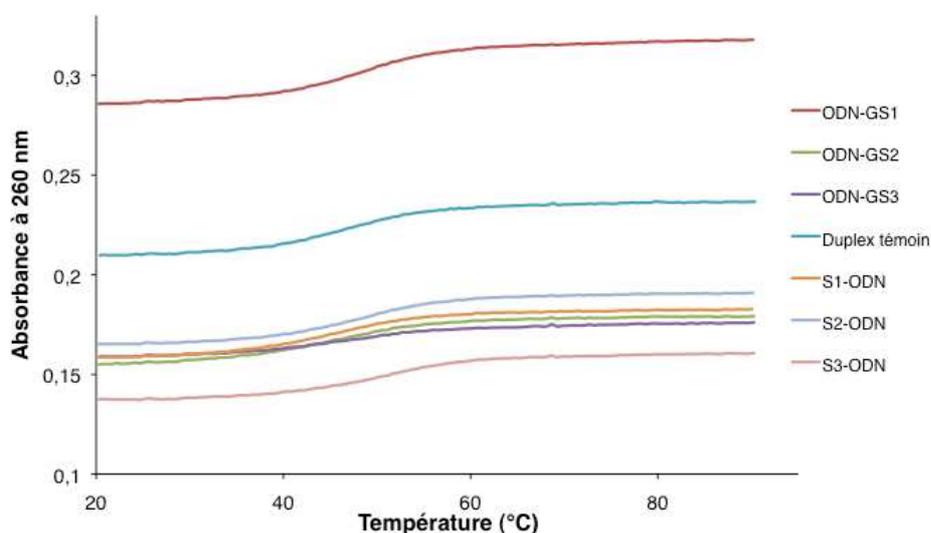


Figure 85 : Courbes et températures de fusion pour [NaCl] = 150 mM

Les résultats obtenus (Figure 85) montrent un gain de stabilité des duplex guanidinospermines par rapport au duplex témoin : +2,9°C pour ODN-GS<sub>1</sub>, +1,9°C pour ODN-GS<sub>2</sub> et +4°C pour ODN-GS<sub>3</sub>. Les oligonucléotides-oligospermines de première génération montrent également une augmentation des  $T_m$  en fonction du nombre de spermines, en accord les résultats obtenus

par Noir et al. [227]. Dans nos conditions ( $[\text{Duplex}] = 1\mu\text{M}$ ,  $[\text{NaCl}] = 150\text{ mM}$ ), ce gain est de  $+1,7^\circ\text{C}$  pour  $\text{S}_1\text{-ODN}$ ,  $+2,9^\circ\text{C}$  pour  $\text{S}_2\text{-ODN}$  et  $+6,9^\circ\text{C}$  pour  $\text{S}_3\text{-ODN}$ . Ces observations sont surprenantes et ne sont pas conformes au but recherché. Dans la mesure où le lien phosphate inter-spermine a été remplacé par une guanidine, chargée positivement, le gain de stabilité apporté par les guanidino-spermines aux duplex devrait être supérieur à celui apporté par les spermines simples.

Afin de mieux observer l'interaction entre le brin complémentaire et les composés  $\text{ODN-GS}_1$ ,  $\text{ODN-GS}_2$  et  $\text{ODN-GS}_3$ , la teneur en sels, connue pour stabiliser la formation des duplex sans spermines a été abaissée à  $[\text{NaCl}] = 50\text{ mM}$ , et la mesure des  $T_m$  a été effectuée pour  $[\text{ODN-GS}_n] = 2\mu\text{M}$  (Figure 86).

Oligonucléotide	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )
$\text{ODN-GS}_1$	42,2	0,3
$\text{ODN-GS}_2$	43,8	1,9
$\text{ODN-GS}_3$	43,5	1,6
Duplex témoin	41,9	-
$\text{S}_1\text{-ODN}$	42,3	0,4
$\text{S}_2\text{-ODN}$	48,1	6,2
$\text{S}_3\text{-ODN}$	53,3	11,4

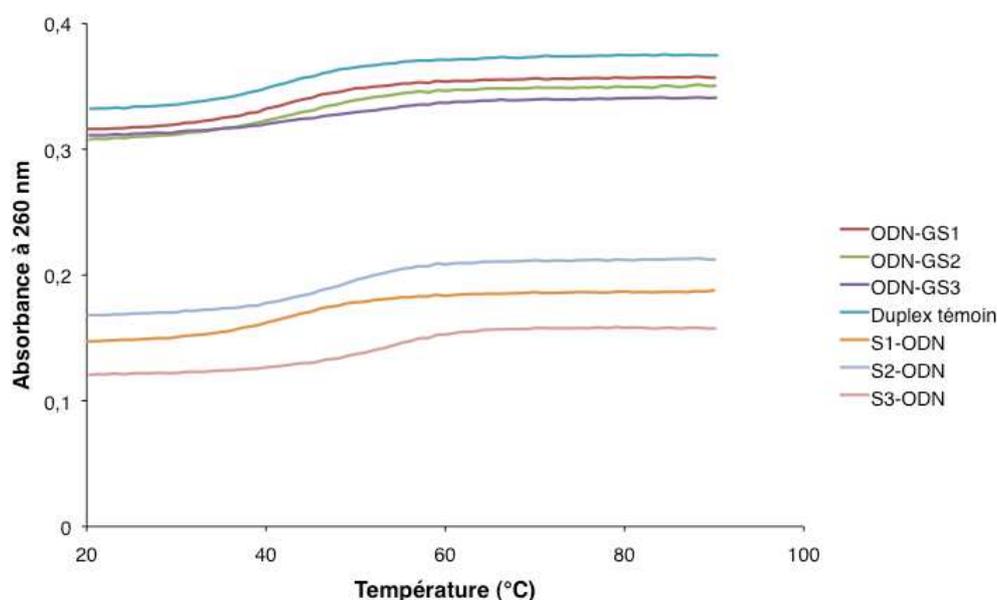


Figure 86 : Courbes et températures de fusion pour  $[\text{NaCl}] = 50\text{ mM}$

Là encore, on observe un gain de stabilité des duplex contenant des guanidinospermines +0,3°C pour ODN-GS<sub>1</sub>, +1,9°C pour ODN-GS<sub>2</sub> et +1,6°C pour ODN-GS<sub>3</sub>. Cependant, les T<sub>m</sub> n'augmentent pas ou faiblement en fonction du nombre de guanidinospermines et sont inférieures aux T<sub>m</sub> observées pour les témoins oligonucléotides-oligospermines de première génération +0,4°C pour S<sub>1</sub>-ODN, +6,2°C pour S<sub>2</sub>-ODN et +11,4°C pour S<sub>3</sub>-ODN. Alors que diminuer la concentration en sels devrait avoir pour conséquence d'augmenter l'effet de la spermine sur la stabilisation des duplex, comme c'est nettement le cas pour les composés S<sub>n</sub>-ODN, l'amélioration des T<sub>m</sub> pour les composés ODN-GS<sub>n</sub> reste modérée. Bien que déroutants, ces résultats confirment les observations faites précédemment. Plusieurs explications peuvent être envisagées pour justifier ces résultats, en premier lieu, la pureté des oligonucléotides employés pour la mesure. Bien que le composé présentant une spermine soit pur, le pic HPLC du composé GS<sub>2</sub>[N]<sub>10</sub> présente un léger épaulement, de même que pour le composé GS<sub>3</sub>[N]<sub>10</sub>. La présence d'une impureté pourrait avoir pour effet de modifier la courbe de montée en température et niveler vers le bas les résultats obtenus. Une purification supplémentaire n'est pourtant pas envisageable sur la quantité d'oligonucléotide résiduelle. D'autre part, il est possible que ces résultats soient liés à la nature même des oligonucléotides-guanidinospermines. On peut envisager en effet que le groupement guanidine, bien que possédant une double liaison délocalisée, induise une certaine rigidification de la chaîne polyaminée par rapport aux spermines reliées par une liaison phosphate, et empêche ainsi le bon repliement de la spermine au sein du duplex. Les répulsions électrostatiques entre les deux brins n'en seraient alors que faiblement diminuées.

## VI. CONCLUSION

En conclusion, nous avons réussi à synthétiser un nouveau synthon spermine efficace pour la réaction de guanidinylation, compatible avec les conditions de déprotection des oligonucléotides et permettant d'évaluer le rendement de couplage grâce à un groupement MMT dosable en UV-visible. Cette synthèse s'est effectuée en huit étapes avec un rendement global de 24%. Les premières étapes de protection orthogonale des groupements amines primaires et secondaires de la spermine s'effectuent avec d'excellents rendements et permettent d'obtenir des produits purs (pureté caractérisée par analyse élémentaire) sans nécessiter de purification fastidieuse par colonne chromatographique. Comme la plupart des

polyamines naturelles et leurs analogues présentent des activités biologiques [238], cette méthode de protection de la spermine, adaptable à grosse échelle pourrait présenter un intérêt dans d'autres domaines de recherche, notamment pour l'élaboration de synthèses totales commercialement exploitables.

Nous sommes également parvenus à synthétiser et caractériser de nouveaux oligonucléotides conjugués à une chaîne polycationique à pH physiologique. Les premiers essais réalisés pour coupler une guanidospermine à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide modifié ont permis d'obtenir un conjugué GS<sub>1</sub>[N]<sub>10</sub>, mais il n'a pas été possible de coupler davantage de spermines à cette extrémité. La modification d'un support dT-CPG pour introduction de spermines en 3' a abouti à des oligonucléotides couplés jusqu'à 3 spermines. Les duplex guanidospermines ODN-GS<sub>1</sub>, ODN-GS<sub>2</sub>, ODN-GS<sub>3</sub> obtenus montrent un gain de stabilité en conditions salines physiologiques par rapport au duplex sans spermine. Il serait intéressant de comparer ces résultats avec la température de fusion des oligonucléotides non conjugués, en présence de spermine libre.

Des améliorations de la synthèse, de la déprotection et de la purification de ces composés sont envisageables. Il est possible, par exemple, de remplacer la liaison phosphoramidate entre l'oligonucléotide et les spermines, sensible aux conditions acides, par un groupement phosphate à l'aide de la molécule de liaison **12**. D'autre part, de premiers essais pour modifier la nature du support par l'introduction d'un lien sarcosyl-succinyl, pour faciliter la déprotection des groupements Npeoc sur support solide, ont démontré que ce nouveau support est résistant aux conditions de déprotection par DBU. Ces tests ont en outre permis de déterminer certains axes d'amélioration. Tout d'abord, le fait qu'une molécule modèle, présentant la même fonction thiourée que notre synthon spermine, couple sur le même support avec de bien meilleurs rendements suggère que notre synthon diffuse moins bien ou que les sites actifs sont moins disponibles. Ceci serait dû vraisemblablement à la présence des groupements Npeoc, qui engendreraient une forte gêne stérique et/ou une rigidification de la structure. Il faudrait donc remplacer ces groupements protecteurs par d'autres, moins encombrants, tout en restant compatibles avec la synthèse d'oligonucléotides. D'autre part, le groupement Fmoc utilisé pour activer la fonction thiourée et protéger la fonction guanidine ne semble pas être parfaitement stable aux conditions réactionnelles. Il faudrait alors soit trouver un nouveau groupement activant, soit modifier le réactif de cap pour éviter une potentielle cyclisation des guanidospermines lors de l'étape de déprotection dans l'ammoniac.

Cependant, compte tenu des difficultés synthétiques et de l'absence d'amélioration des propriétés des oligonucléotides-guanidospermines ODN-GS<sub>n</sub> en comparaison à la

génération d'oligonucléotides-oligospermines  $S_n$ -ODN précédente, il a semblé plus judicieux de se consacrer à l'étude de ces derniers composés. Ainsi les prochains chapitres s'attachent dans un premier temps à adapter la synthèse des oligonucléotides-oligospermines pour une application biologique : une correction de l'épissage alternatif. Dans un second temps, des oligonucléotides ARN cationiques ont été conjugués à des parties lipophiles et étudiés *in vitro* pour une application en ARN interférence



# Chapitre 3 : Oligonucléotides antisens cationiques appliqués à une correction de l'épissage alternatif



## I. INTRODUCTION

Dans cette partie, nous montrerons qu'il est possible d'adapter nos oligonucléotides conjugués de première génération à une application antisens évoquée au chapitre 1 : la correction de l'épissage alternatif. Des oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates simples brins ont été conjugués à cet effet à un nombre variable de spermines : 15, 20, 25 et 30 spermines. Des séquences contrôles ont d'autre part été effectuées pour contrôler la spécificité de nos oligonucléotides cationiques. Enfin, une vérification de la pénétration cellulaire de nos composés, une étude de leur concentration efficace et de leur cytotoxicité puis un suivi de leur cinétique d'action ont été réalisés.

## II. SYNTHÈSE DES OLIGORIBONUCLEOTIDES 2'-OME, PHOSPHOROTHIOATES CATIONIQUES

Ces travaux font suite à une étude préliminaire accomplie au sein du laboratoire par Mitsuharu Kotera, Émilie Voirin (synthèse) et Marc Nothisen (biologie cellulaire). Les oligonucléotides employés ciblent le site d'épissage aberrant créé par une mutation sur la séquence 705 du gène de la  $\beta$ -globine humaine. Il s'agit d'oligonucléotides 18-mers, noté par la suite [ON-705]: 5'-CCU CUU ACC UCA GUU ACdA-3' [239], conjugués à leur extrémité 5' à un nombre de 5, 10, 15 et 20 spermines. Lors de ces travaux antérieurs, cette séquence a été réalisée avec des modifications 2'-OMe sur les sucres et un squelette phosphorothioate. En effet, les oligoribonucléotides antisens appliqués à la correction de l'épissage alternatif sont simple brin, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 (p.22). Comme ils ne sont pas transfectés à l'aide d'un vecteur, ils ne sont donc plus protégés par un quelconque agent de transfection de l'attaque par des nucléases. Or les ARN simples brins en particulier sont très facilement dégradables. Ces modifications ont donc pour but d'augmenter la stabilité des nos oligonucléotides-polyamines. D'autre part, comme abordé dans le premier chapitre, ce type de modifications se prête assez bien à l'application au niveau de l'ARN pré-messager que ce soit *in vivo* chez des souris *mdx* [240] ou des chiens de race golden retriever [241] ou pour des essais cliniques [46, 48]. Les résultats obtenus *in vitro* sur un

modèle correction de l'épissage alternatif décrit p.119 ont montré une activité optimale pour les oligonucléotides comprenant 15 et 20 spermines, à des concentrations submicromolaires. Mon travail de thèse a donc consisté à synthétiser d'une part de nouveaux composés [ON-705] 2'-OMe phosphorothioates conjugués à un nombre supérieur de spermines (15, 20, 25 et 30 spermines) pour déterminer les paramètres optimaux pour une efficacité biologique, et d'autre part, des séquences contrôles couplées (ou non) à 15 spermines pour s'assurer de la spécificité des oligonucléotides conjugués obtenus (Figure 87). Ces séquences contrôles doivent permettre de s'assurer que la présence de spermines ne génère pas d'effet aspécifique. Il s'agit des séquences suivantes :

- la séquence [ON 119], décrite par Kole et coll. [242] (Tableau 6), qui cible la séquence 119 également présente dans l'intron 2 de la  $\beta$ -globine humaine, mais adjacente au site d'épissage aberrant,
- la séquence [ON 705 M] décrite également par Kole et coll. [242] qui ne présente qu'un seul mésappariement souligné en noir dans le Tableau 6, par rapport à la séquence [ON 705],
- la séquence [ON 705 scr], décrite par Resina et al. [243] (Tableau 6), qui arbore le même nombre de nucléotides A, C, G, U que la séquence [ON 705], mais placés dans un ordre aléatoire.

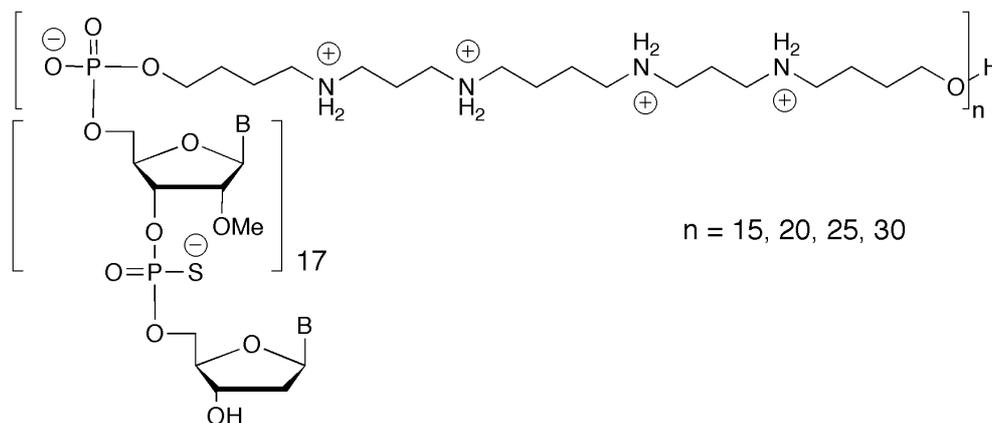


Figure 87 : Schéma général des oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates cationiques

Des oligonucléotides fluorescents  $S_{20}$ [ON-705]Fluo et [ON-705]Fluo ont par ailleurs été réalisés par Mitsuharu Kotera pour observer la pénétration cellulaire des oligonucléotides résultants. Les oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates ont donc été synthétisés automatiquement à l'échelle d'une micromole avec des rendements de couplage pour les

nucléotides phosphoramidites 2'-OMe (protection Ultramild) et pour les phosphoramidites spermines  $\geq 95\%$  et en conservant le groupement trityle final pour purification.

Pour des raisons pratiques, le premier nucléotide utilisé est un nucléotide ADN. La sulfuration des oligonucléotides a été réalisée à l'aide du réactif de Beaucage à raison de 3 min de réaction par cycle. Le couplage de la première spermine à la jonction entre l'oligonucléotide et la queue polyamine, ainsi que les couplages ultérieurs de spermine ont nécessité une adaptation du cycle de couplage. D'autre part, le lien inter-spermine phosphate est conservé et n'est pas remplacé par une liaison phosphorothioate. Ces composés ont ensuite été déprotégés et décrochés du support dans de l'ammoniac aqueux 28%, avant d'être purifiés sur cartouche Polypak II.

### **III. CARACTERISATION DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS CATIONIQUES**

La présence d'un squelette phosphorothioate génère pour chaque nucléotide introduit deux stéréoisomères. Les oligonucléotides obtenus se présentent donc comme un mélange de 2<sup>17</sup> isomères, ce qui n'affecte en rien leur efficacité biologique. Cependant, leur analyse par spectre HPLC peut s'avérer problématique. Ces oligonucléotides ont donc été caractérisés par spectrométrie de masse et par gel d'électrophorèse.

#### **A. Caractérisation par spectrométrie de masse et évaluation du rendement**

Un certain nombre d'oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF par Jean-Marc Strub. La méthode d'analyse par spectrométrie de masse a déjà été décrite dans le chapitre 2 (p.100). Les masses ainsi que les rendements obtenus pour nos oligonucléotides sont répertoriés dans le Tableau 6. Ces rendements ont été calculés par dosage UV à 260 nm.

Nom (5' → 3')	Séquence (5' → 3')	Quantité (nmol)	MH <sup>+</sup> calc (Da)	MH <sup>+</sup> obs (Da)
[ON-705]	CCU CUU ACC UCA GUU ACdA	110	6069	6069
[ON-705M]	CCU CUU AC <u>A</u> UCA GUU ACdA	88	6093	n.d.
[ON-705scr]	ACU ACC CGA UAU CUC CUdC	84	6069	n.d.
[ON-119]	UGA GAC UUC CAC ACU GAdT	36	6187	n.d.
S <sub>15</sub> [ON-705]	S <sub>15</sub> -CCU CUU ACC UCA GUU ACdA	61	12196	12225
S <sub>20</sub> [ON-705]	S <sub>20</sub> -CCU CUU ACC UCA GUU ACdA	50	14239	n.d.
S <sub>25</sub> [ON-705]	S <sub>25</sub> -CCU CUU ACC UCA GUU ACdA	11	16282	n.d.
S <sub>30</sub> [ON-705]	S <sub>30</sub> -CCU CUU ACC UCA GUU ACdA	66	18324	n.d.
S <sub>15</sub> [ON-705M]	S <sub>15</sub> -CCU CUU ACA UCA GUU ACdA	55	12220	12311
S <sub>15</sub> [ON-705scr]	S <sub>15</sub> -ACU ACC CGA UAU CUC CUdC	120	12196	n.d.
S <sub>15</sub> [ON-119]	S <sub>15</sub> -UGA GAC UUC CAC ACU GAdT	97	12313	n.d.
[ON-705]Fluo*	CCU CUU ACC UCA GUU ACA-F	300	6684	6690
S <sub>20</sub> [ON-705]Fluo*	S <sub>20</sub> -CCU CUU ACC UCA GUU ACA-F	40	14855	14880

**Tableau 6 : Quantité isolée et caractérisation par masse**

(\* réalisés par Mitsuharu Kotera)

## B. Caractérisation par gel d'électrophorèse

L'analyse de la pureté des oligonucléotides sur gel d'électrophorèse a été effectuée par Marc Nothisen. L'électrophorèse est l'une des principales techniques utilisées en biologie pour caractériser des macromolécules. Les biomolécules migrent dans un gel soumis à un champ électrique en fonction de leurs propriétés physiques : taille, forme et/ou charge électrique. Les acides nucléiques sont communément séparés sur gel d'agarose. Toutefois, la présence de spermines chargées positivement modifie quelque peu les propriétés de nos oligonucléotides. Dans notre cas, la migration s'effectue alors sur gel de polyacrylamide. Très utilisé pour la séparation de peptides et de protéines, le gel de polyacrylamide est également adapté à la caractérisation d'oligonucléotides. C'est un gel réticulé obtenu par polymérisation

d'acrylamide et de bis-acrylamide. Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus les mailles du réseau constituant le gel sont étroites. En conséquence, les molécules de plus grande taille migreront plus lentement. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide peut se réaliser en conditions natives : les échantillons déposés dans les puits du gel ne subissent aucun traitement ou en condition dénaturantes : les charges des molécules sont masquées par la présence d'un détergent ionique : le sodium dodécyl sulfate (SDS). Les molécules ne migrent alors plus du tout en fonction de leur charge, mais seulement en fonction de leur taille.

Dans notre cas, le gel utilisé est donc le gel précoulé Criterion™ XT de gradient 4-12% Bis-Tris (Bio-Rad). Il permet habituellement la séparation des protéines de 10 kDa à 250 kDa en fonction leur poids moléculaire, en ayant recours à un tampon de migration dénaturant : le XT MES (Bio-Rad). Nos oligonucléotides cationiques sont donc séparés en fonction de leur taille. Afin de visualiser la position des oligonucléotides dans le gel, celui-ci est révélé avec un agent d'intercalation des acides nucléiques, le bromure d'éthidium qui fluoresce avec une couleur rouge orangée lorsqu'il est soumis à des rayons UV. Comme ce réactif s'intercale entre les paires de bases, seuls les duplex peuvent théoriquement être révélés par cette technique. Or, contrairement aux oligonucléotides simples brins usuels, la présence de spermines permet la révélation de nos oligonucléotides cationiques par du bromure d'éthidium. Nos composés ont ainsi pu être observés (Figure 88).

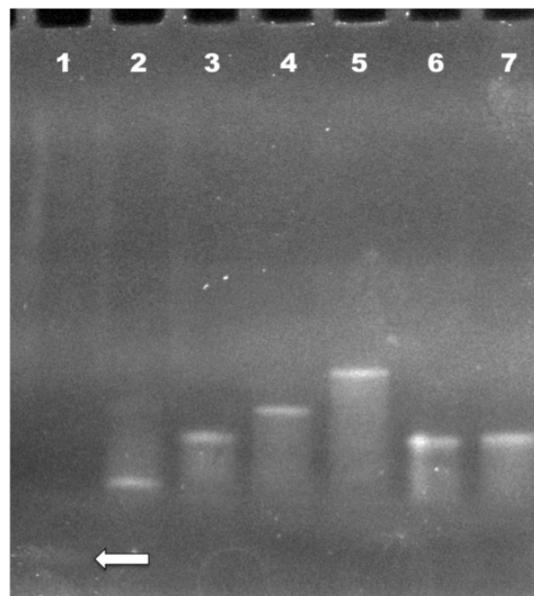


Figure 88 : Gel d'électrophorèse des oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates.

1. [ON-705] (flèche blanche), 2. S<sub>5</sub>[ON-705], 3. S<sub>15</sub>[ON-705], 4. S<sub>20</sub>[ON-705], 5. S<sub>30</sub>[ON-705], 6. S<sub>15</sub>[ON-705scr], 7. S<sub>15</sub>[ON-119]

Les résultats obtenus montrent clairement un décalage des bandes correspondant aux oligonucléotides en fonction du nombre de spermines conjuguées. La position de l'oligonucléotide sans spermine est indiquée par une flèche blanche. Le fait que les bandes obtenues soient fines et présentent peu de « traînées » souligne une assez bonne pureté des oligonucléotides cationiques.

## **IV. ÉVALUATION DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS CATIONIQUES EN BIOLOGIE CELLULAIRE**

Toutes les expériences de biologie cellulaire ont été effectuées par Marc Nothisen.

### **A. Pénétration cellulaire des oligonucléotides antisens cationiques**

Afin de s'assurer que les oligonucléotides-polyamines sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules sans aucun agent de transfection, un oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705] conjugué à un fluorophore, la fluorescéine (S<sub>20</sub>[ON-705]Fluo) a été mis en présence de cellules du cancer du col de l'utérus, les HeLa. Son devenir au bout de 45 min, 2 h puis 4 h a été observé à l'aide d'un microscope à épifluorescence. La conjugaison à 20 spermines n'est pas fortuite, elle correspond à l'oligonucléotide présentant la meilleure efficacité biologique (cf. p.123) Pour comparaison, des cellules HeLa ont été traitées avec un oligonucléotide sans spermine fluorescent de même séquence [ON-705]Fluo et portant les mêmes modifications 2'-OMe phosphorothioates. Les observations sont réalisées à l'aide d'un milieu ne présentant pas de rouge de phénol, afin d'éviter toute perturbation de l'analyse. Les résultats obtenus (Figure 89) montrent clairement que les oligonucléotides cationiques S<sub>20</sub>[ON-705]Fluo sont capables de pénétrer dans les cellules **sans agent de transfection** pour une concentration de 0,4 µM et 1 µM. La transfection est amorcée à t+2 h et semble maximale à t+4 h pour une concentration de 0,4 µM, alors que pour une concentration de 1 µM, la transfection semble déjà quasi-optimale à t+2h, et débute dès t+45 min. D'autre part, toute la cellule semble être transfectée : aussi bien le cytoplasme que le noyau, comme le montre le halo vert diffus. Dans le même temps, un oligonucléotide [ON-705]Fluo sans spermine ni vecteur s'avère incapable de transférer les cellules, même pour une concentration de 1 µM.

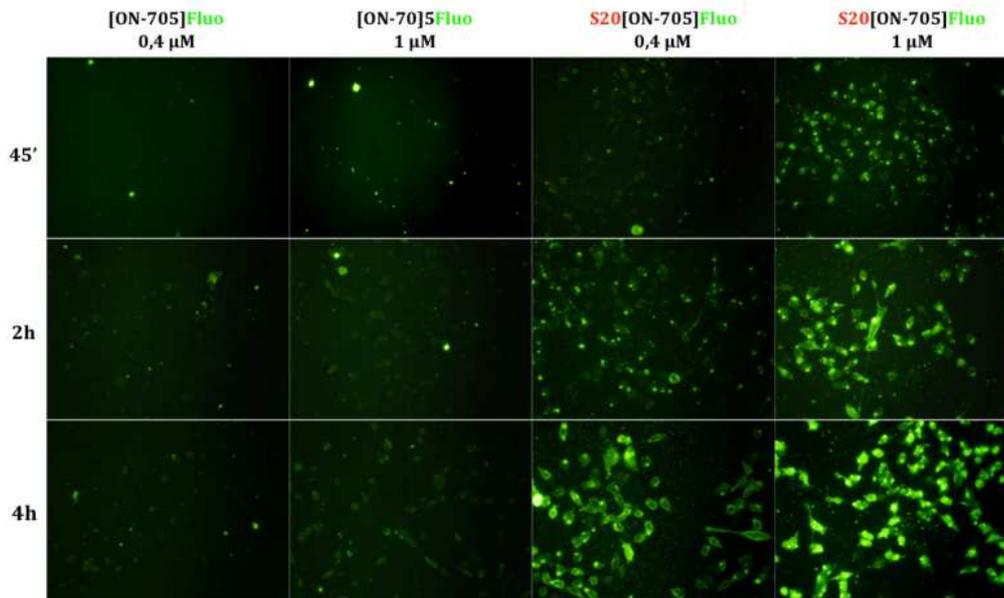


Figure 89 : Pénétration cellulaire d'un oligonucléotide cationique S<sub>20</sub>[ON-705]Fluo

## B. Étude de la spécificité et de l'efficacité des oligonucléotides antisens cationiques

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, des oligonucléotides antisens simples brins se lient à des sites d'épissage au niveau de l'ARN pré-messager pour empêcher, de façon stérique, la traduction de transcrit contenant des mutations en protéines : c'est la technique de correction de l'épissage alternatif. Afin de vérifier la capacité de nos oligonucléotides à bloquer effectivement des sites d'épissage aberrant, nous avons choisi un modèle cellulaire décrit par Kole et coll. [239, 243]. Il s'agit de cellules du cancer du col de l'utérus transfectées de façon stable par un plasmide pLuc/705 : les HeLa pLuc/705. Ces cellules contiennent donc le gène de la luciférase dans lequel l'intron 2 muté IVS2-705 de la  $\beta$ -globine observé dans les cas de  $\beta$ -thalassémie humaine a été inséré. La présence de cet intron empêche la traduction d'une luciférase fonctionnelle. Il possède en effet un site d'épissage 5' aberrant créé par la séquence mutée 705 (mutation d'une thymine en guanine), qui active un site d'épissage 3' cryptique à 126 nucléotides de distance, provoquant l'insertion de ce tronçon dans la séquence codant pour la luciférase ainsi que la génération d'un codon stop [239]. Si les oligonucléotides antisens ciblent correctement la séquence 705 de l'intron, ils empêchent alors la reconnaissance de ce site d'épissage aberrant par le splicéosome, et c'est l'ensemble de l'intron qui est excisé, comme dans le cas d'un épissage normal (Figure 90).

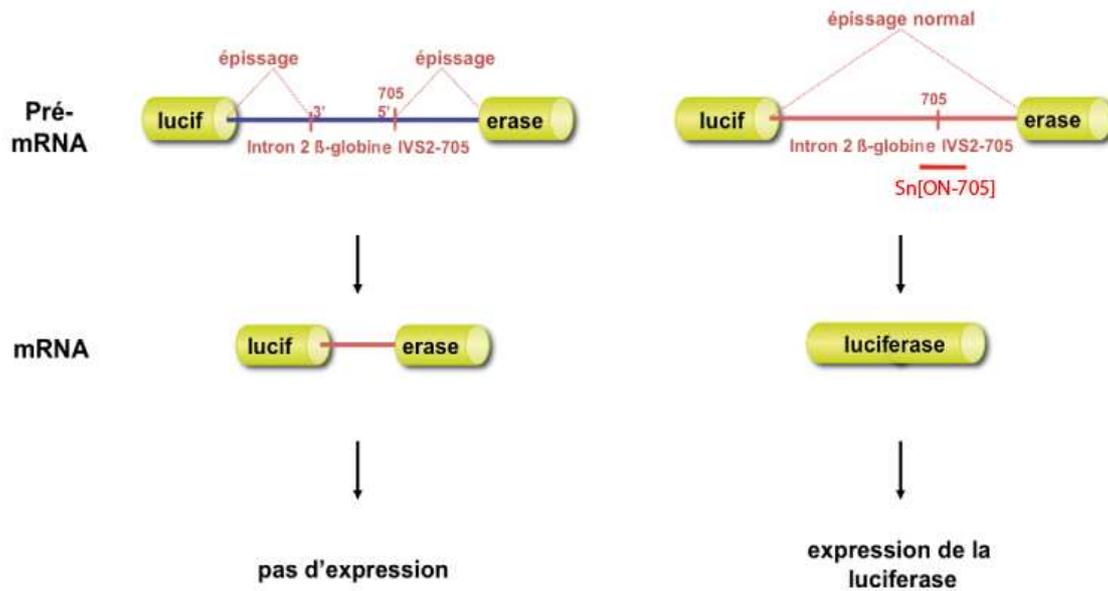


Figure 90 : Modèle de gène rapporteur

Puisque la luciférase est une enzyme impliquée dans la luminescence de la luciole, la restauration de l'expression du gène de la luciférase peut être mesurée par luminescence. La cytotoxicité de nos composés a par ailleurs été évaluée par dosage des protéines cellulaires. Pour toutes les expériences *in vitro* décrites dans ce chapitre, les tests ont été effectués en l'absence de sérum. Le milieu contenant les cellules n'a été supplémenté en sérum de veau foetal qu'après 4 h d'incubation des oligonucléotides cationiques.

Une première étude a été réalisée afin, d'une part, d'observer les concentrations efficaces pour nos composés S<sub>20</sub>[ON-705] et S<sub>30</sub>[ON-705] et d'autre part, d'attester de la spécificité de nos oligonucléotides cationiques à l'aide des oligonucléotides contrôles S<sub>15</sub>[ON-705scr], S<sub>15</sub>[ON-119] et S<sub>15</sub>[ON-705M] à la concentration maximale testée : 0,4 µM (Figure 91). Après dépôt des oligonucléotides sur les cellules aux concentrations souhaitées, et ajout de milieu contenant du sérum à t+4 h, les cellules sont lysées et la luminescence mesurée à t+31 h. À titre de contrôle négatif, la luminescence des cellules seules ou mises en présence de l'oligonucléotide [ON-705] sans spermines ni vecteur de transfection a été mesurée. En guise de témoin positif, l'oligonucléotide [ON-705] a été transfecté à une concentration de 0,2 µM par un vecteur de référence, le jetSI™-Endo (Polyplus Transfection) selon le protocole du fabricant. Les résultats obtenus montrent une assez bonne spécificité de nos oligonucléotides cationiques, puisque l'expression de la luciférase n'est pas augmentée de façon flagrante en présence des composés S<sub>15</sub>[ON-119] et S<sub>15</sub>[ON-705scr] à la concentration maximale de 0,4 µM, et sont cohérents avec ce qui est observé pour les oligonucléotides

[ON-119] et [ON-705scr] transfecté par le jetSI™-Endo (0,2  $\mu$ M). L'activité du composé S<sub>15</sub>[ON-705M] à cette concentration est un peu plus significative, mais cette aspécificité reste inférieure à celle observée pour le même oligonucléotide sans spermine [ON-705M] transfecté (0,2  $\mu$ M). Il n'est par ailleurs pas étonnant d'observer une certaine activité d'un oligonucléotide présentant un seul mésappariement. Contrairement aux siRNAs, dont la complémentarité parfaite de séquence joue un rôle primordial pour leur activité, le mécanisme de correction de l'épissage alternatif requiert essentiellement un blocage stérique de l'accès du splicéosome et autres facteurs d'épissage au transcrit pré-messager et est donc moins sensible à la présence de mésappariements. Ce phénomène d'effet aspécifique de l'oligonucléotide [ON-705M] a par ailleurs été observé par Kole et coll. [239], par transfection de l'oligonucléotide avec de la lipofectamine, à des concentrations comprises entre 0,1  $\mu$ M et 0,4  $\mu$ M. La conjugaison de spermines ne génèrent donc pas de « faux positifs » et conserve la spécificité des oligonucléotides correspondants.

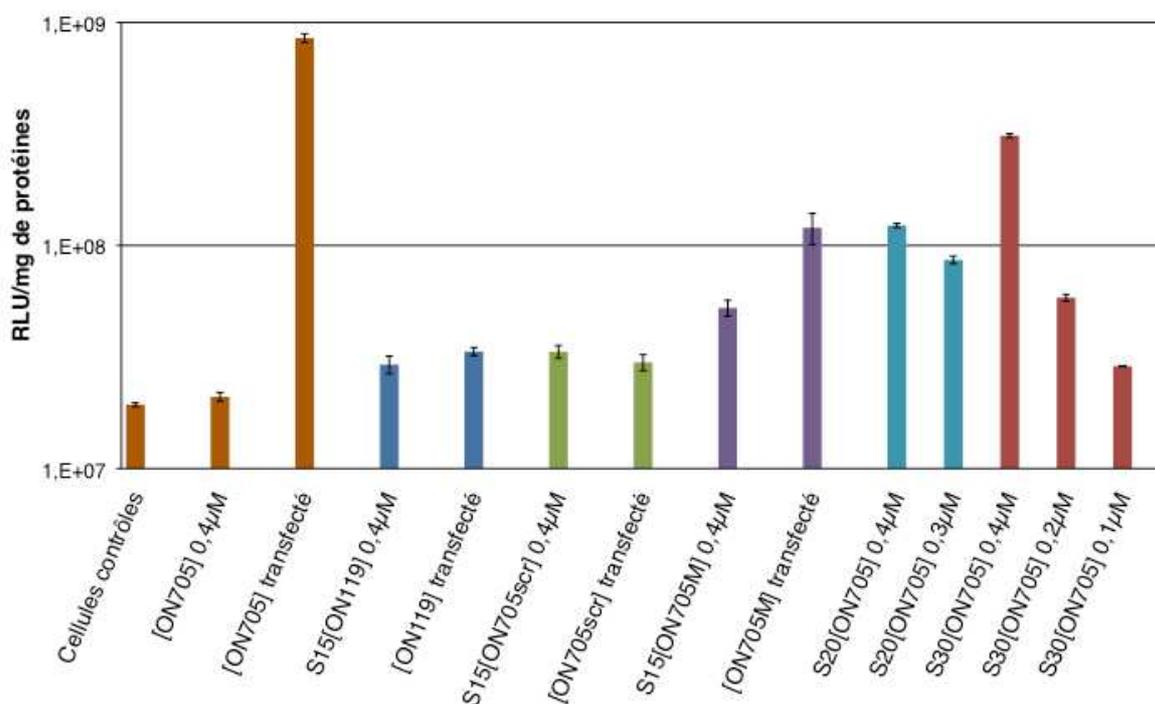
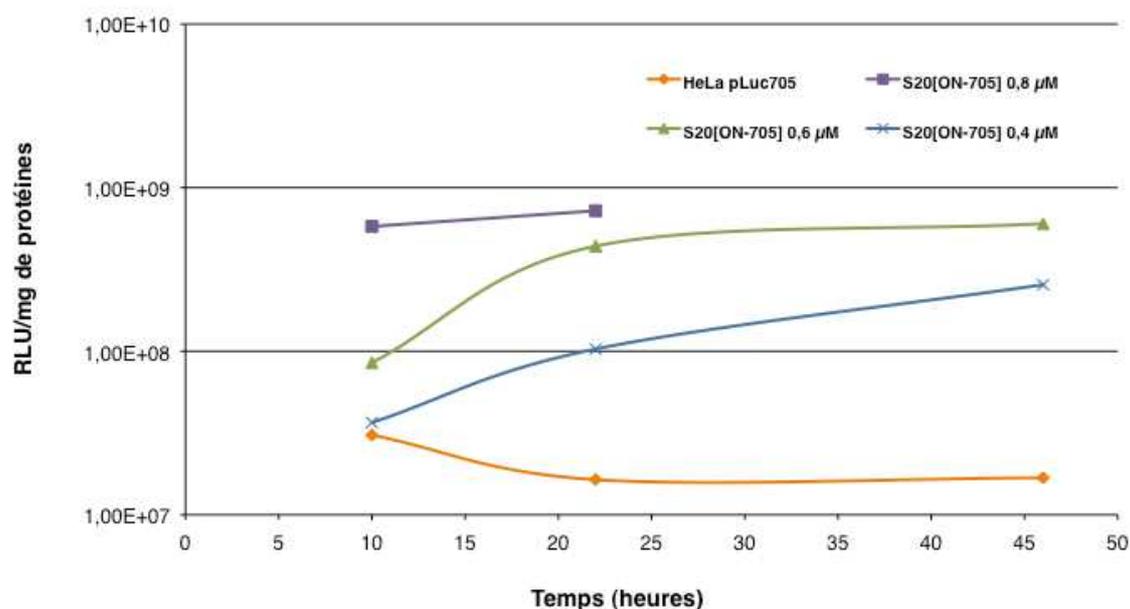


Figure 91 : Étude de l'efficacité et de la spécificité des oligonucléotides cationiques

En terme d'efficacité, le composé qui semble présenter les meilleurs résultats est le composé S<sub>30</sub>[ON-705] à une concentration de 0,4  $\mu$ M (15 fois l'expression basale des cellules seules). Toutefois à cette concentration, la cytotoxicité cellulaire observée est non négligeable (58% de survie cellulaire). Il est à noter que cette cytotoxicité s'apparenterait davantage à un

ralentissement de la croissance des cellules qu'à une réelle mort cellulaire. Un autre candidat potentiel est le S<sub>20</sub>[ON-705] à une concentration de 0,4 µM (6 fois l'expression basale des cellules seules) qui présente une survie cellulaire améliorée (75%). Une étude plus approfondie de ce composé a donc été réalisée afin d'affiner le choix de la concentration optimale (Figure 92). Toutefois, l'activité observée pour ces deux oligonucléotides reste inférieure à l'oligonucléotide [ON-705] sans spermine transfecté à l'aide du jetSI™-Endo (0,2 µM). Le jetSI™-Endo est un lipide cationique qui forme des lipoplexes avec les oligonucléotides qui sédimentent sur les cellules au cours de l'expérience, augmentant ainsi la concentration locale d'acides nucléiques, ce qui explique sa grande efficacité.



**Figure 92 : Restauration de l'expression du gène de la luciférase par l'oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705]**

Les tests effectués sur l'oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705] montrent une bonne efficacité de ce composé pour une concentration de 0,8 µM (19 fois l'expression basale dès 10 h et jusqu'à près de 44 fois à t+22 h). Cependant à cette concentration-là, cet oligonucléotide s'avère très toxique : la survie cellulaire décroît dans le même temps de 58% à 18%. À 0,6 µM et 0,4 µM, l'expression de la luciférase augmente jusqu'à t+46 h pour atteindre respectivement 35 fois et 15 fois l'expression basale. Alors que le taux de survie cellulaire est élevé à t+10 h (respectivement 89% et 91%), à t+46 h en revanche, il ne s'élève plus qu'à 53% et 63%. Au vu de ces résultats, pour conserver une bonne efficacité, tout en mitigant les toxicités, il a été

décidé d'effectuer une étude cinétique sur l'oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705] pour une concentration de 0,5 µM en ce composé. De même, en se basant sur les données décrites précédemment (Figure 91), l'oligonucléotide S<sub>30</sub>[ON-705] est utilisé pour l'étude cinétique avec une concentration de 0,3 µM afin d'avoir un bon compromis entre efficacité et cytotoxicité. Le choix de la concentration de 0,6 µM pour le composé S<sub>15</sub>[ON-705] est basé sur la déduction de son efficacité en fonction des concentrations utilisées pour l'oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705].

### C. Étude cinétique de l'activité des oligonucléotides antisens cationiques

La restauration de l'expression génétique à l'aide de nos oligonucléotides cationiques a été évaluée au cours du temps, pour les concentrations présentant le meilleur compromis efficacité / cytotoxicité, établies au paragraphe précédent. Les oligonucléotides S<sub>15</sub>[ON-705], S<sub>20</sub>[ON-705] et S<sub>30</sub>[ON-705], à des concentrations respectives de 0,6 µM, 0,5 µM, et 0,3 µM, ainsi que deux des séquences contrôles S<sub>15</sub>[ON-705scr] et S<sub>15</sub>[ON-119] à des concentrations de 0,6 µM ont donc été testés sur un période de 142 h (environ 6 jours, Figure 93). Les résultats sont exprimés à partir des cellules HeLa pLuc705 témoins, considérées comme à 100% d'expression du gène de la luciférase. Bien que le gène de la luciférase ne soit théoriquement pas fonctionnel, ces cellules expriment une luminescence intrinsèque, qui correspond à du bruit de fond. L'effet obtenu par les oligonucléotides conjugués à 15, 20 et 30 spermines est maximal après 45 h d'incubation environ : soit 23 fois l'expression basale des cellules HeLa pLuc705 non traitées pour S<sub>20</sub>[ON-705], 15 fois l'expression basale pour S<sub>15</sub>[ON-705], et 7 fois l'expression basale pour S<sub>30</sub>[ON-705]. Pour ces trois oligonucléotides cationiques à de telles concentrations, le rétablissement de l'expression du gène perdure jusqu'à 118 h où il s'élève encore respectivement à 7 fois, 6 fois et 3,5 fois l'expression basale. Cette cinétique est très différente de celle observée par exemple par Résina et al. [243] pour des oligonucléotides 2'-OMe délivrés à l'aide de lipoplexes (130 nM), pour lesquels l'efficacité maximale intervient au bout de 24 h et l'effet semble presque aboli à 48 h. Il est à noter que les oligonucléotides S<sub>15</sub>[ON-705scr] et S<sub>15</sub>[ON-119] ne permettent pas de rétablir l'expression du gène de la luciférase, confirmant une fois de plus, la bonne spécificité de nos oligonucléotides conjugués.

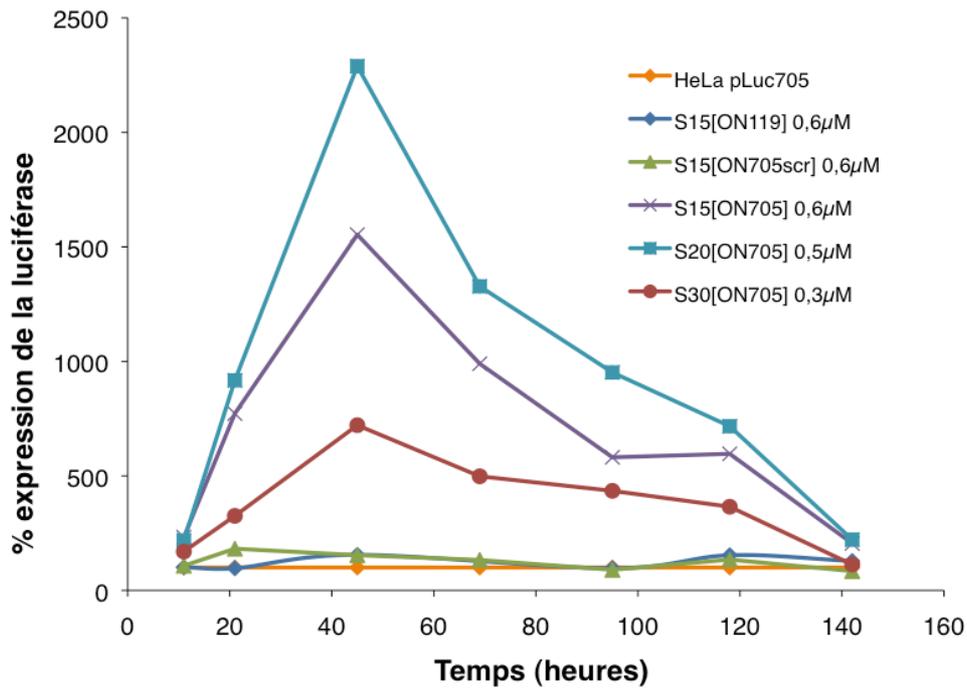


Figure 93 : Cinétique de rétablissement de l'expression de la luciférase

Nos oligonucléotides cationiques ont d'autre part été comparés à l'oligonucléotide [ON-705] transfecté par le vecteur de référence, le jetSI™-Endo à une concentration de 0,2 μM. L'efficacité maximale de l'oligonucléotide transfecté est supérieure à celle observée pour nos oligonucléotides et s'élève jusqu'à 58 fois l'expression basale (t+21 h). Cependant pour des temps d'expression plus longs, l'effet résiduel de l'oligonucléotide transfecté par le vecteur de référence est inférieur ou égal à celui observé pour l'oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705] à 0,5 μM.

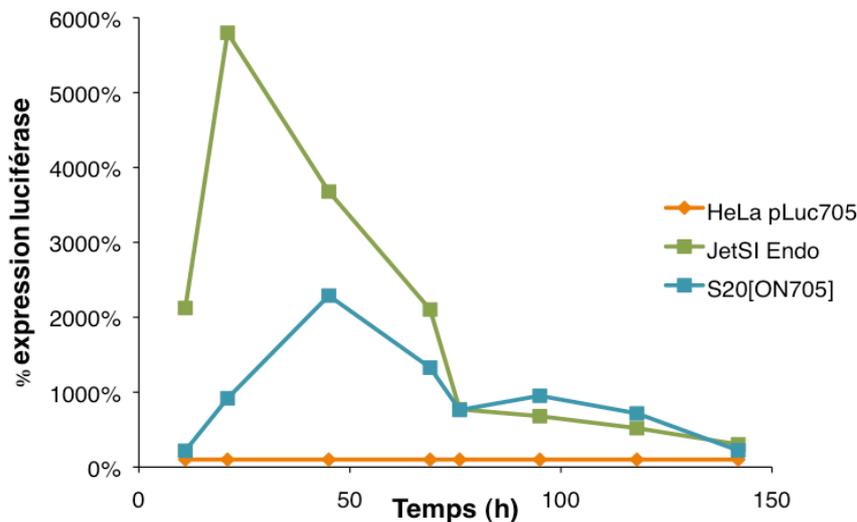


Figure 94 : Efficacité et cinétique d'action des oligonucléotides S<sub>20</sub>[ON-705] et [ON-705] transfecté

## V. CONCLUSION

En conclusion, le couplage de spermines à l'extrémité 5' permet d'obtenir des oligonucléotides de charge globale cationique avec un squelette modifié 2'-OMe phosphorothioate. Un oligonucléotide cationique de référence, le S<sub>20</sub>[ON-705]Fluo est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules **sans aucun agent de transfection** en 2 h à 4 h, pour une concentration de 0,4 µM. Une première étude *in vitro* à l'aide du gène rapporteur de la luciférase a permis d'évaluer la spécificité de nos oligonucléotides cationiques, la quantité de spermines et les concentrations des composés S<sub>n</sub>[ON-705] présentant le meilleur compromis efficacité / cytotoxicité. Ces résultats ont montré une spécificité conservée en présence de spermines car les contrôles S<sub>15</sub>[ON-705scr] et S<sub>15</sub>[ON-119] à 0,4 µM puis 0,6 µM (étude cinétique) n'engendrent pas de restauration significative de l'expression de la luciférase. Le composé qui semble avoir la meilleure efficacité (jusqu'à 23 fois l'expression basale), sans que ce soit au détriment de la survie cellulaire est l'oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705] pour des concentrations aux alentours de 0,4-0,5 µM. Enfin, bien que l'intensité de l'expression génétique restaurée soit moins forte que pour l'oligonucléotide [ON-705] transfecté, nos oligonucléotides cationiques présentent une cinétique d'action particulièrement intéressante, puisqu'ils sont encore actifs après 5 jours d'incubation.



# Chapitre 4 : Synthèse et évaluation de siRNAs cationiques lipophiles



## I. INTRODUCTION

Dans ce chapitre, de nouveaux composés siRNAs cationiques lipophiles ont été synthétisés puis caractérisés. Leur capacité à s'auto-arranger a été observée par microscopie électronique en transmission. Leur évaluation en biologie cellulaire a ensuite permis de déterminer leur efficacité et leur toxicité seuls ou pré-associés avec un « cargo moléculaire » : l'albumine. Cette efficacité a de plus été testée en présence de sérum.

Comme cela a déjà été évoqué au chapitre 1 (p.18), le mécanisme d'ARN interférence découvert en 1998 [12] présente un intérêt immense pour ses applications potentielles dans le domaine thérapeutique. Depuis l'identification des siRNAs comme intermédiaires-clés dans les cellules de mammifères en 2001 [14], de nombreux essais cliniques basés sur ces composés se sont rapidement développés [20, 244]. Toutefois l'utilisation de siRNAs *in vitro* ou *in vivo* en tant que « médicaments » rencontre deux principaux obstacles. Tout d'abord, le squelette naturel des siRNAs présente une faible stabilité chimique et enzymatique. D'autre part, les siRNAs sont incapables de rentrer seuls dans les cellules et nécessitent d'être vectorisés. De nombreux vecteurs synthétiques, précédemment développés pour la thérapie génique ou pour les oligonucléotides antisens, ont été rapidement testés et adaptés à la délivrance de siRNAs et ont montré d'excellents résultats *in vitro*. Ces vecteurs, décrits dans le chapitre 1 (p.30), ont pour double vocation d'acheminer les siRNAs vers les cellules et de protéger leur intégrité face aux nucléases présentes dans le sérum. Cependant ils souffrent de nombreuses limitations pour leur utilisation *in vivo* en raison de leur poids moléculaire élevé : une réponse immunitaire [39, 245], des effets non-spécifiques, une agrégation sur des structures anioniques de plus grosse taille ou une mauvaise diffusion dans les tissus [20, 246]. En théorie, la délivrance de molécules à la place de particules devrait résoudre la plupart de ces problèmes. Pour cela, il est possible de conjuguer de façon covalente les siRNAs à des molécules responsables de leur internalisation par les cellules. Dans cette optique, la conjugaison de siRNAs à des parties lipidiques ou des peptides cationiques a montré des résultats intéressants *in vitro* comme *in vivo* [160, 162, 193, 247, 248]. Toutefois, l'effet *in vivo* était soit limité [193], soit nécessitait de fortes doses [160, 162], ou était parfois accompagné de réponse immunitaire [193]. Dans notre cas, nous avons adapté le couplage répétitif de spermines précédemment évoqué (p.51) à la synthèse d'oligonucléotides ARN.

Cette conjugaison de polyamine a été effectuée à l'extrémité 5' du brin passager, conférant une charge globalement positive au siRNA résultant (Figure 95) [203]. Ces siRNAs cationiques ont démontré *in vitro* une capacité à entrer dans les cellules sans agent de transfection et à éteindre efficacement l'expression d'un gène en l'absence de sérum [203]. Ces siRNAs présentent un squelette non modifié afin d'éviter toute perte d'activité biologique, et ne sont plus protégés par aucun vecteur de transfection. Nous avons donc anticipé que leur résistance aux nucléases du sérum devait être améliorée. Pour cela, les siRNAs cationiques ont été couplés à trois lipides différents. Nous avons supposé que la pré-association de ces parties lipidiques avec des protéines sériques pourrait aboutir à la formation de « cargos » moléculaires. La formation de tels assemblages devrait stériquement empêcher l'approche des nucléases, favoriser la circulation systémique des siRNAs par injection intraveineuse en évitant leur excrétion rénale [244] et prolonger ainsi leur demi-vie *in vivo*. La protéine sérique choisie pour cette étude préliminaire *in vitro* est l'albumine puisqu'elle représente 60% des protéines du plasma chez l'homme, pour des concentrations comprises entre 38 g.L<sup>-1</sup> et 48 g.L<sup>-1</sup>, et qu'elle a déjà été utilisée par d'autres laboratoires en tant que « transporteur » de siRNAs lipidiques [160].

## II. SYNTHÈSE DE siRNAs CATIONIQUES LIPOPHILES

La synthèse et la purification d'oligonucléotides cationiques lipophiles ont été réalisées par Jérémy Bagilet.

Conformément à une précédente étude menée au sein du laboratoire sur l'efficacité de siRNAs cationiques [203], la séquence employée pour nos expériences est la séquence GL3 du gène modifié de la luciférase de la luciole *Photinus Pyralis*. Dans le mécanisme d'ARN interférence, seul le brin antisens entre en jeu dans la reconnaissance de l'ARN messager cible à cliver [249]. Ainsi, pour éviter des effets aspécifiques liés à la présence de spermines ou de lipides lors de cette étape, et sachant que la position 5' du brin antisens est cruciale pour préserver l'activité d'ARN interférence [13, 203], les modifications ont porté sur l'extrémité 5' du brin passager. D'autre part, l'ouverture du duplex et la sélection du brin antisens se fait par le complexe enzymatique RLC (RISC loading complex) du côté du siRNA thermodynamiquement le moins stable [17, 18]. La présence de spermines en 5' du brin

passager (ou sens) va stabiliser par interactions électrostatiques cette extrémité du siRNA et ainsi privilégier la prise en charge du brin souhaité (brin guide ou antisens) par le complexe RISC. Coupler les spermines à l'extrémité 3' du brin sens, au contraire, aurait pour effet de stabiliser l'extrémité 5'as/3'ss du siRNA et donc de défavoriser la prise en charge du brin antisens. La séquence antisens GL3as comprend 19 nucléotides auxquels s'ajoutent deux nucléotides T non appariés à son extrémité 3' : 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA GTT. La présence de ces deux nucléotides non appariés a pour effet d'améliorer l'efficacité d'interférence des siRNAs [250]. La séquence GL3ss synthétisée pour conjugaison avec les spermines et les parties lipidiques est la suivante : 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT. Toujours en accord avec l'étude réalisée sur les siRNAs cationiques [203], 30 spermines sont couplées à l'extrémité 5' de cette séquence. Trois lipides sont ensuite conjugués aux oligonucléotides cationiques : un résidu cholestérol ou une ou deux chaînes carbonées de 12 et 24 carbones (Figure 95).

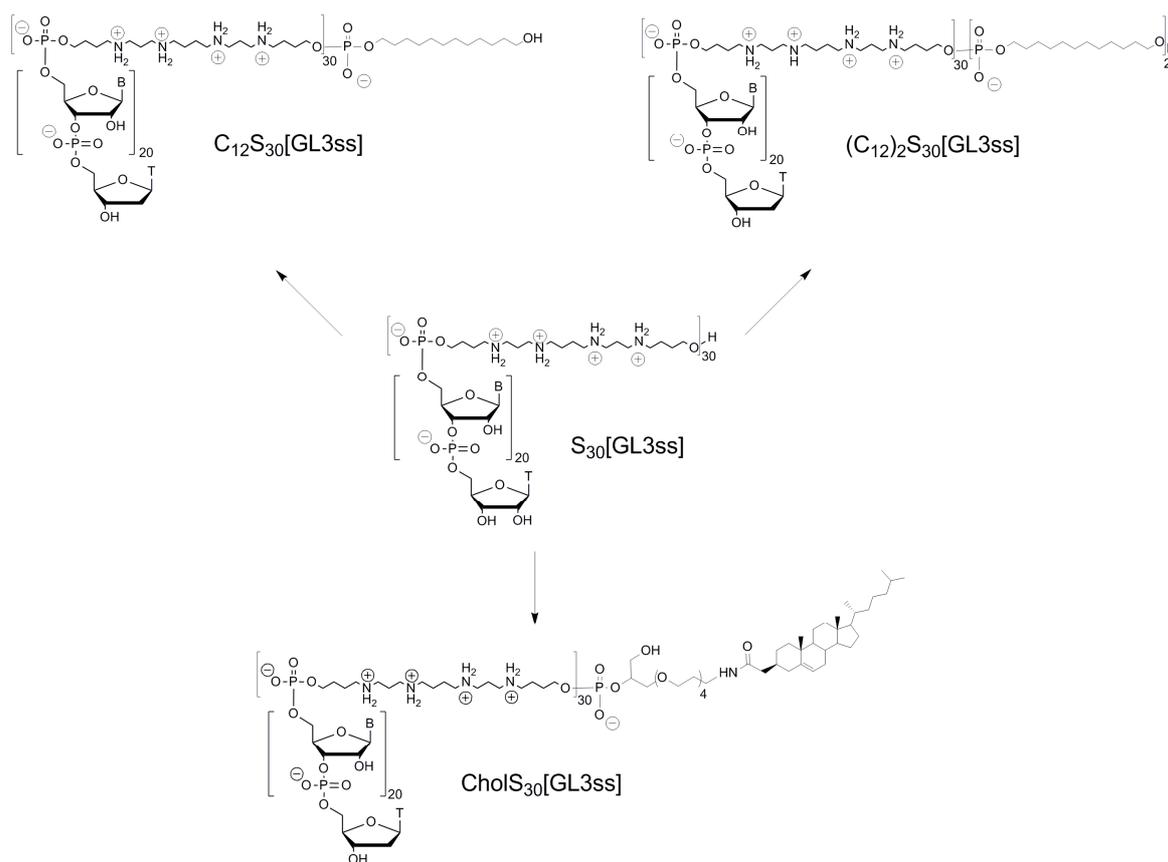


Figure 95 : Oligonucléotide cationique et ses analogues lipidiques

Le rendement de couplage moyen des nucléotides est  $\geq 97\%$ , celui des spermines et des lipides est  $\geq 95\%$ . La sélectivité de la séquence GL3as dont le brin passager est hybridé à des

spermines ( $S_{30}$ [GL3ss]) a déjà été étudiée [203] en testant de façon similaire la séquence GL2as porté par un brin passager  $S_{30}$ [GL2ss]. La séquence GL2 cible une autre variante du gène de la luciférase de la luciole *Photinus Pyralis* : le gène GL2. Ce gène est identique à 95% au gène GL3 et les séquences GL2 et GL3 ne diffèrent que par 3 de leurs 21 nucléotides. Les résultats ont montré une parfaite sélectivité de la séquence GL3, puisqu'aucune activité d'interférence n'a été détectée pour la séquence GL2. En toute rigueur, il faudrait à nouveau tester les séquences passagères Chol $S_{30}$ [GL2],  $C_{12}S_{30}$ [GL2] et  $(C_{12})_2 S_{30}$ [GL2] comme contrôles négatifs. Toutefois, compte tenu des résultats précédents [203] et du fait que les spermines et les parties lipidiques sont portées par le brin passager et n'entrent pas en jeu dans le mécanisme de clivage de l'ARN messager, la probabilité d'aspécificité a été considérée comme très faible et ses séquences n'ont pas été réalisées. Seuls les témoins portant les parties lipidiques ou la partie cationique ont été synthétisés et hybridés à la séquence GL3as :  $S_{30}$ [GL3ss], Chol[GL3ss],  $C_{12}$ [GL3ss] et  $(C_{12})_2$ [GL3ss]. Le témoin portant le segment polyamine sert de contrôle positif pour l'efficacité des analogues siRNAs cationiques lipophiles. Les témoins portant les résidus lipidiques permettent de mesurer l'apport de la partie lipophile. En guise de second témoin positif, un siRNA GL3 sans spermine a été transfecté à l'aide d'un vecteur lipidique cationique commercial de référence, l'INTERFERin™ à une concentration de 10 nM (voir p.143).

### III. CARACTERISATION DE SIRNAS CATIONIQUES LIPOPHILES

Après synthèse, les oligonucléotides cationiques lipophiles ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Leur pureté a ensuite été évaluée par gel d'électrophorèse. Leur capacité éventuelle à s'auto-assembler ou se présenter sous forme de molécules isolées a été observée par microscopie électronique en transmission (MET) de même que leur interaction avec de l'albumine.

#### A. Spectrométrie de masse

Les oligonucléotides cationiques lipophiles et leurs témoins correspondants ont été caractérisés en spectrométrie de masse MALDI-TOF par Jean-Marc Strub. Le principe de ce

type de spectrométrie de masse a déjà été abordé au chapitre 2 (p.100). Les masses observées sont répertoriées dans le Tableau 7, ainsi que les rendements de synthèse.

Nom (5' → 3')	Qté isolée (nmol)	[MH] <sup>+</sup> calculée (Da)	[MH] <sup>+</sup> observée (Da)
S <sub>30</sub> [GL3ss]	15	18852	18844
CholS <sub>30</sub> [GL3ss]	4	19608	19649
	5	19608	n.d.
C <sub>12</sub> S <sub>30</sub> [GL3ss]	12	19116	19194
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>30</sub> [GL3ss]	4	19380	19382
	6	19380	n.d.
C <sub>12</sub> [GL3ss]	96	6871	6879
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> [GL3ss]	117	7135	7148
Chol[GL3ss]	17	7359	7372

**Tableau 7 : Caractérisation par spectrométrie de masse et quantités isolées**

## B. Gel d'électrophorèse

Les conditions d'analyse sur gel d'électrophorèse employées pour nos expériences ont été préalablement optimisées par Marc Nothisen pour la migration d'ARN cationiques. Comme pour les oligonucléotides cationiques antisens décrits au chapitre 3, le gel utilisé est un gel de polyacrylamide Nupage Bis-Tris à gradient 4-12% (Invitrogen). La séparation des acides nucléiques s'effectue à pH = 7. Bien que ce gel ne contienne pas de SDS, le tampon de migration utilisé (MOPS-SDS) en contient. La séparation se fait alors en conditions dénaturantes : les oligonucléotides sont séparés en fonction de leurs tailles respectives. Comme le gel utilisé est fin, après migration, les oligonucléotides simples et doubles brins sont révélés par éclairage UV. Les acides nucléiques sont connus pour absorber autour de 260 nm. Le gel est alors placé sur plaque CCM fluorescente et éclairé par une lampe UV à

254 nm. Les oligonucléotides absorbant à cette longueur d'onde, leur ombre sera projetée sur la plaque. Les bandes noires ainsi obtenues correspondent à leur position respective sur le gel. Pour distinguer les oligonucléotides simples brins des oligonucléotides doubles brins, le gel est ensuite marqué à l'aide de bromure d'éthidium.

### 1. Détermination des conditions d'hybridation des duplex

Dans un premier temps, un gel d'électrophorèse est réalisé afin de vérifier qu'une variation des conditions d'hybridation par rapport à ce qui a été précédemment décrit [203] n'affecte pas la formation du duplex cationique correspondant. Ainsi l'oligonucléotide  $S_{30}[\text{GL3ss}]$  a été hybridé à un oligonucléotide ARN de séquence complémentaire dans trois tampons différents : 1) Tampon Tris 50 mM,  $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,5$  2) Tampon Tris 50 mM,  $\text{pH} = 7,5$  3) Eau « RNase free ». Dans chaque tampon, les oligonucléotides sont chauffés pendant 2 min à  $93^\circ\text{C}$  puis hybridés lors du refroidissement lent des solutions. Sachant que les spermines réduisent les répulsions électrostatiques entre les deux brins d'ARN, la présence de sels pour stabiliser le duplex n'est plus nécessaire [202], le but de l'expérience consiste à s'en affranchir. Les résultats obtenus après migration pendant 90 min à 120 V montrent une hybridation du composé dans les trois conditions testées (Figure 96-2, révélation au BET). Pour limiter la présence de sel, les échantillons seront donc par la suite hybridés dans de l'eau « RNase free ».

Dans le détail, sur le premier gel (Figure 96-1), on voit que l'oligonucléotide simple brin  $S_{30}[\text{GL3ss}]$  est très retardé par rapport à l'oligonucléotide simple brin complémentaire GL3as, qui migre presque dans le front de migration. Ceci s'explique par le gain de masse apporté par les 30 spermines. On constate également que le composé  $S_{30}[\text{GL3ss}]$  n'est pas parfaitement pur, car on aperçoit une légère bande proche du front de migration. La formation des duplex est attestée par le menu décalage entre la bande de l'oligonucléotide simple brin  $S_{30}[\text{GL3ss}]$  et les duplex correspondants  $S_{30}[\text{GL3}]$  dans les différents tampons. Les duplex, tout comme pour l'oligonucléotide simple brin  $S_{30}[\text{GL3ss}]$  présente des impuretés avoisinant le front de migration, coïncidant soit à un excès du brin sans spermine, soit aux impuretés présentes pour  $S_{30}[\text{GL3ss}]$ . De même qu'au chapitre 3, sur le second gel (Figure 96-2), l'oligonucléotide simple brin  $S_{30}[\text{GL3ss}]$  est révélé au BET, quoique de façon moins intense que les duplex correspondants. Comme précédemment, cette visualisation est attribuée à la présence de spermines, puisque le simple brin nu GL3as n'apparaît pas sur le gel. La révélation intense au

BET indique clairement que les duplex se sont formés. Il est à noter que l'impureté révélée par observation en UV n'apparaît plus pour les échantillons correspondants aux duplex. Le seul duplex siRNA formé est donc le S<sub>30</sub>GL3.

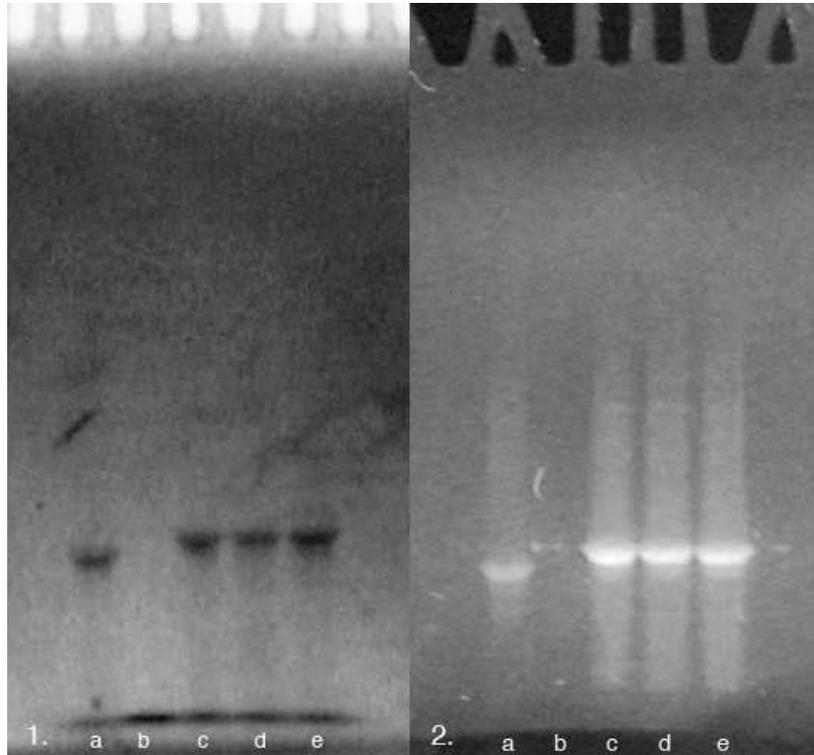
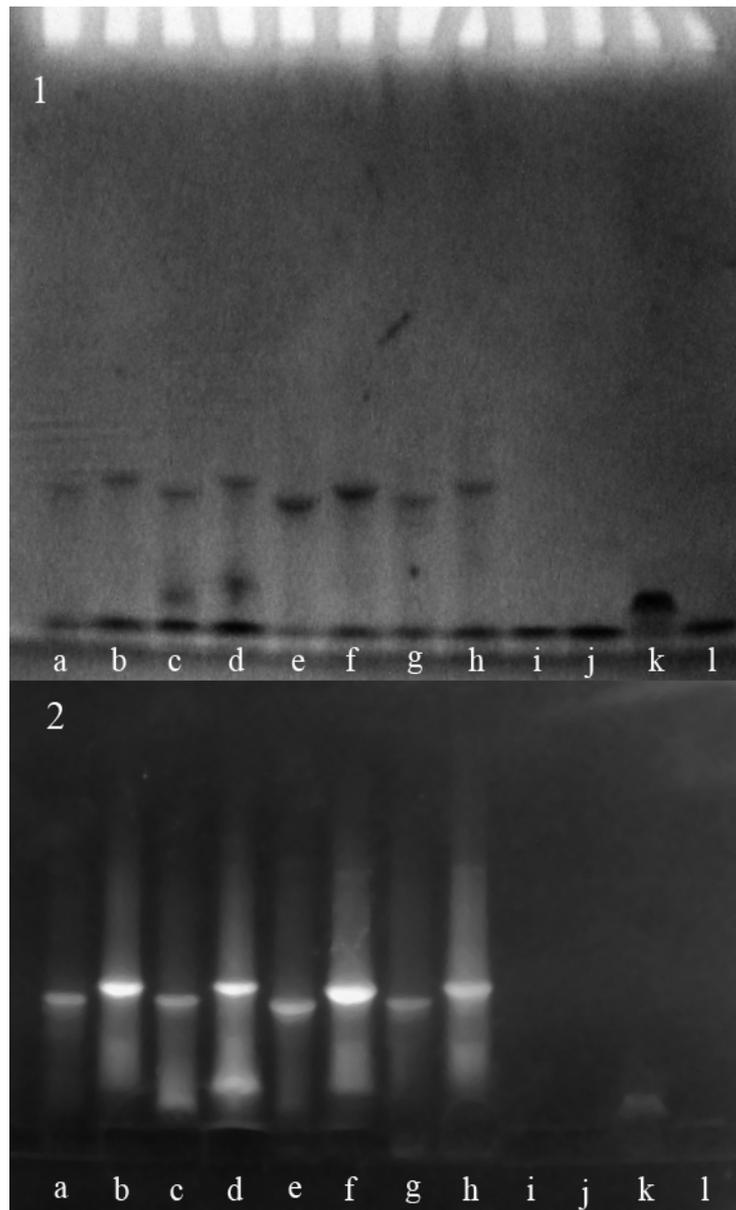


Figure 96 : Analyse par gel d'électrophorèse de l'hybridation des siRNAs cationiques.

1. Révélation par UV. 2 Révélation par BET. a. S<sub>30</sub>[GL3ss], b. GL3as, c. S<sub>30</sub>[GL3], eau « RNase free », d. S<sub>30</sub>[GL3], tampon Tris, e. S<sub>30</sub>[GL3], tampon tris/NaCl.

## 2. Caractérisations des oligonucléotides cationiques lipophiles et de leurs témoins

Afin d'apprécier la pureté des oligonucléotides obtenus, les oligonucléotides cationiques lipophiles simples et doubles brins ainsi que les oligonucléotides témoins simples brins sont analysés par migration sur gel d'électrophorèse pendant 90 min à 120V (Figure 97).



**Figure 97 : Gel d'électrophorèse des oligonucléotides cationiques lipophiles.**

**1. Révélation par UV, 2. Révélation au bromure d'éthidium:** a.  $C_{12}S_{30}[GL3ss]$ , b.  $C_{12}S_{30}GL3$ , c.  $CholS_{30}[GL3ss]$ , d.  $CholS_{30}GL3$ , e.  $S_{30}[GL3ss]$ , f.  $S_{30}GL3$ , g.  $(C_{12})_2S_{30}[GL3ss]$ , h.  $(C_{12})_2S_{30}GL3$ , i.  $[GL3as]$ , j.  $C_{12}[GL3ss]$ , k.  $Chol[GL3ss]$ , l.  $(C_{12})_2[GL3 ss]$ .

Sur le premier gel révélé en UV (Figure 97-1), les oligonucléotides témoins :  $[GL3as]$  (i),  $C_{12}[GL3ss]$  (j) et  $(C_{12})_2[GL3 ss]$  (l), sans spermines, apparaissent proches du front de migration, à l'exception de l'oligonucléotide  $Chol[GL3ss]$  (k), qui est un peu plus retenu en raison de la présence du groupement cholestérol. Les oligonucléotides cationiques lipophiles migrent beaucoup moins loin sur le gel en raison de leur masse plus élevée, avec un léger décalage entre oligonucléotides simples et doubles brins. Une fois encore, la présence de spermines permet leur visualisation sous forme simple brin par révélation au bromure d'éthidium. Dans une moindre mesure, les parties lipophiles des oligonucléotides témoins

(C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>[GL3ss] et Chol[GL3ss] permettent également leur visualisation en présence de BET, sans doute par interactions hydrophobes entre les lipides et l'agent intercalant. Les oligonucléotides cationiques lipophiles simples brins présentent tous une impureté dans le front de migration. Alors que ces impuretés n'apparaissent pas en tant que duplex sur le gel révélé au BET, le composé CholS<sub>30</sub>[GL3ss] présente une bande additionnelle entre le produit attendu et l'impureté proche du front de migration, qui elle, forme un ARN double brin (colonne d. Figure 97-2). Cette impureté semble correspondre au composé Chol[GL3ss] si on se base sur la distance de migration. Toutefois, la probabilité de formation d'un tel produit paraît faible, au regard des étapes de synthèses. En ce qui concerne l'impureté que l'on retrouve de façon récurrente attenante au front de migration, deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer sa nature, mais ne sont pas totalement satisfaisantes. Il peut s'agir d'ARN dégradé. Les nucléotides libres absorbant beaucoup plus aux alentours de 260 nm que sous forme polymérisée ou de double hélice (hypochromicité des acides nucléiques), leur proportion serait alors surestimée par observation de l'intensité des bandes. Bien que cette hypothèse soit en accord avec l'absence de formation d'un duplex correspondant, il est fort probable que des nucléotides seuls migrent carrément dans le front de migration. On peut aussi supposer qu'il y a un site de clivage préférentiel entre le dernier nucléotide et la première spermine. Un clivage partiel pourrait avoir eu lieu dans les conditions de migration sur gel, générant ainsi une impureté oligonucléotide sans spermines. Toutefois, cette impureté devrait également apparaître en tant que duplex.

### C. Caractérisation par microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est focalisé sur un échantillon très mince (épaisseur submicrométrique). Le microscope électronique peut fonctionner en deux modes principaux : le mode diffraction et le mode image. Le mode diffraction utilise le comportement ondulatoire des électrons : au contact de matière organisée, les électrons vont être diffractés dans des directions qui vont être dépendantes de la disposition des atomes. Par le biais de lentilles magnétiques, ces faisceaux sont recombinaés pour former une image. En mode image, le faisceau d'électrons interagit avec l'échantillon en fonction de son épaisseur, sa densité ou sa nature chimique, ce qui aboutit à la formation d'une image contrastée, obtenue dans le plan image. L'image est en fait obtenue « par transparence » de la zone observée (Figure 98, source : Wikipédia).

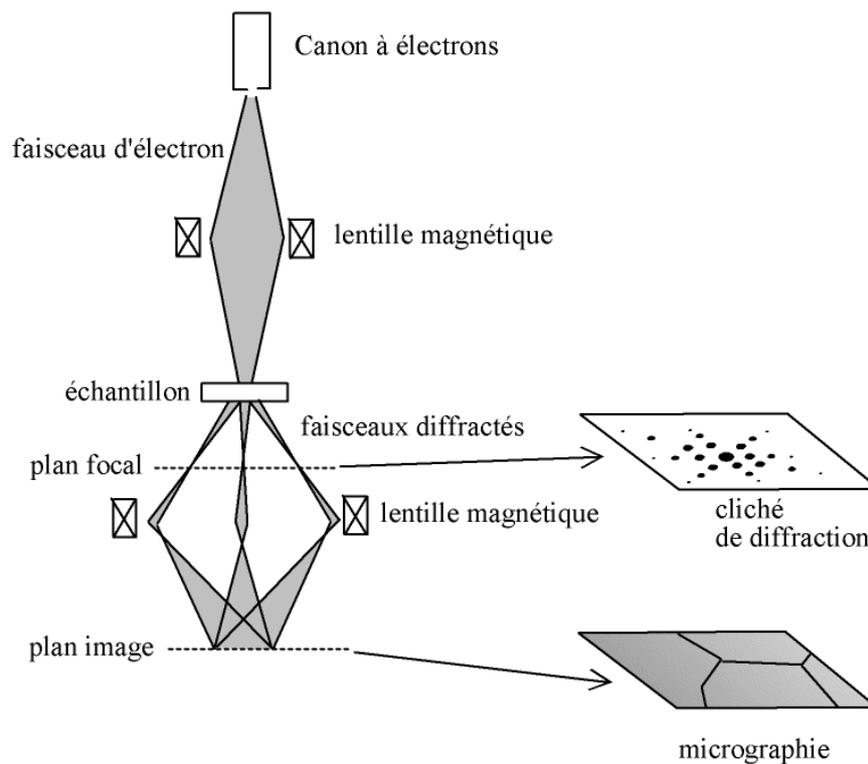
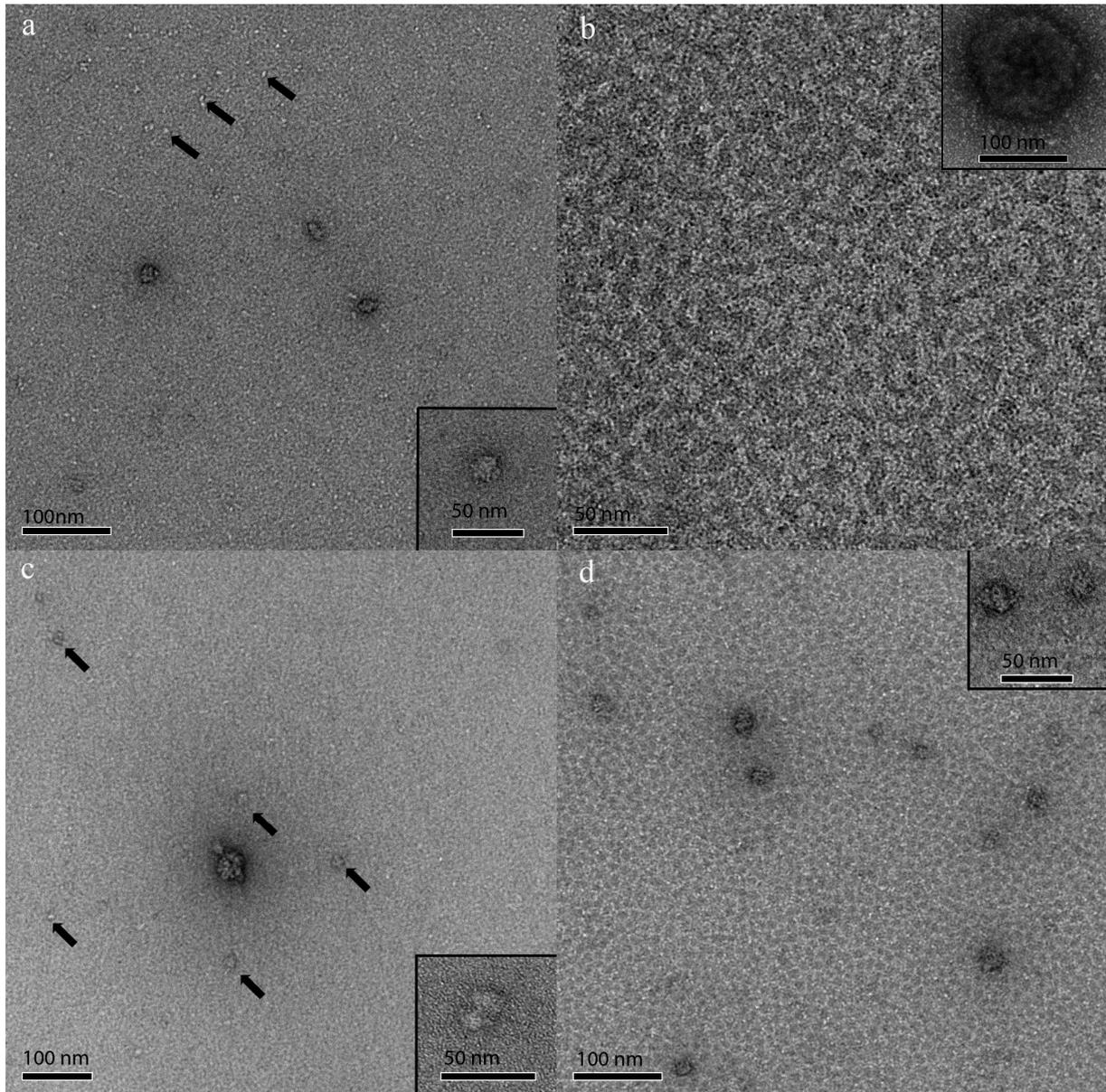


Figure 98 : Schéma de fonctionnement d'un microscope électronique en transmission.

### 1. Caractérisation des siRNAs cationiques lipophiles

Les images de microscopie électronique en transmission (MET) ont été réalisées soit par Emmanuelle Morin, soit par Jean-Serge Remy.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si les siRNAs cationiques, avec ou sans groupements lipidiques, sont sous forme de molécules isolées ou sont capables de s'auto-arranger pour élaborer des structures. Les oligonucléotides présentant des parties lipidiques sont en effet connus pour s'auto-organiser en micelles [251] ou vésicules [252, 253]. Pour cela, nous avons préparés les échantillons de MET à l'une des concentrations les plus utilisées lors du dépôt sur les cellules : 100 nM, dans un milieu sans sérum (Opti-MEM), pour ne pas gêner la visualisation des siRNAs, ni occasionner de dégradation des acides nucléiques.



**Figure 99 : Images de MET des siRNAs.**

**a. S<sub>30</sub>GL3 ; b. CholS<sub>30</sub>GL3 ; c. C<sub>12</sub>S<sub>30</sub>GL3 ; d. (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>GL3**

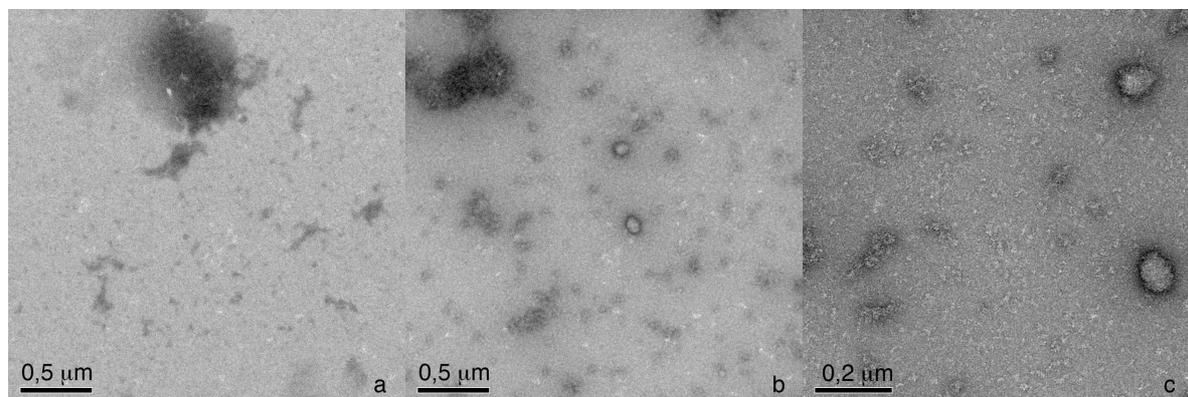
Les images obtenues pour le siRNA cationique S<sub>30</sub>GL3 (Figure 99-a) montrent principalement des structures rondes de 4 à 6 nm (indiquées par des flèches noires), qui devraient équivaloir à des molécules (quasi-)individuelles. En effet, ces mesures correspondent à l'ordre de grandeur observé pour des siRNAs sans spermines. Les siRNAs classiques présentent un diamètre de 2,6 nm pour un pas d'hélice d'une hauteur de 2,8 nm (11 nucléotides) sous leur conformation A (conformation privilégiée) [254]. De façon peu surprenante, certaines particules rondes d'une vingtaine de nanomètres sont également visibles (Figure 99-a, zoom dans l'encart en bas, à gauche de la photo) ainsi que quelques

rare particules de 60 nm (non représentées). Ces objets montrent la capacité de nos siRNAs cationiques à s'auto-assembler à cette concentration. Le siRNA amphiphile CholS<sub>30</sub>GL3 (Figure 99-b) présente essentiellement un tapis de micelles tubulaires. La forme de ces micelles suggère un système hautement dynamique. Au milieu de ce parterre de micelles se trouvent également de grosses particules sphériques de 130 nm (encart de la Figure 99-b). Parmi les quatre siRNAs cationiques, le composé C<sub>12</sub>S<sub>30</sub>GL3 (Figure 99-c) montre le plus de particules rondes, avec deux distributions de taille : 15 nm et 50 nm. Les structures de 15 nm sont indiquées par des flèches et un zoom a été effectué sur une particule de 50 nm (encart). Enfin, le siRNA (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>GL3 (Figure 99-d) se caractérise essentiellement par des micelles rondes et la présence de quelques structures de 25 nm (zoom dans l'encart). En revanche, aucune structure n'est distinguée pour le témoin siRNA nu GL3 (donnée non montrée). Les résultats obtenus montrent que les siRNAs cationiques lipidiques sont tous capables de s'auto-arranger pour former différents types de structures nanométriques à une concentration de 100 nM. Le siRNA cationique présente quant à lui un mélange de molécules auto-assemblées et libres. D'autres analyses préalablement menées sur un nanosizer pour évaluer la taille de nos composés dans les mêmes conditions, en présence de milieu Opti-MEM sans sérum (mesure en nombre) n'ont pas permis d'obtenir de données fiables, comme l'indique le logiciel de mesure DTS (Nano).

## 2. Caractérisation de l'interaction siRNAs amphiphiles-Albumine

Afin de vérifier l'interaction entre les siRNAs cationiques lipidiques et de l'albumine de veau foetal, de premiers essais ont été effectués à une concentration en siRNA de 100 nM, en présence de 250 équivalents molaires de protéine (10 mg.mL<sup>-1</sup>), en accord avec ce qui a été réalisé en biologie cellulaire. Pour cet excès, aucune des structures observées au paragraphe précédent n'apparaît pour les composés S<sub>30</sub>GL3, C<sub>12</sub>S<sub>30</sub>GL3 et (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>GL3, suggérant indirectement que l'interaction entre l'albumine et les composés s'est bien effectuée à ces concentrations-là. Les images correspondantes montrent seulement la présence d'ombres indistinctes, caractéristiques de la présence de protéines, dont un exemple est donné en Figure 100-a. Seul le composé CholS<sub>30</sub>GL3 arbore, en plus de l'albumine, deux objets de 130 nm déjà observés auparavant (Figure 100-b). Un zoom effectué sur ces deux particules (Figure 100-c) montre des contours bien définis, et confirment qu'il s'agit du même type de structures nanométriques que celles observées précédemment. Toutefois, la présence de ces

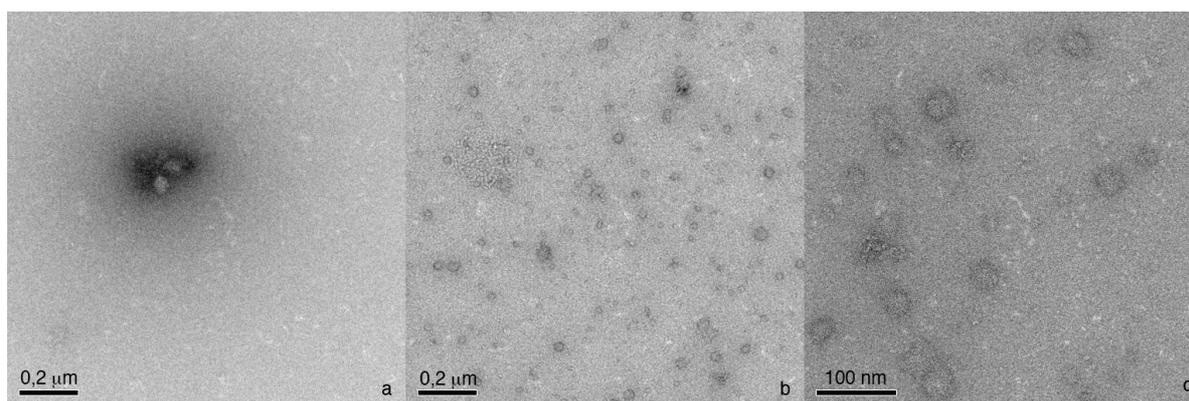
particules est fortuite et la disparition des structures micellaires sous-entend que la majorité du matériel engagé interagit avec l'albumine.



**Figure 100 : Images de MET en présence d'albumine ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).**

**a.  $\text{C}_{12}\text{S}_{30}\text{GL3} / 250 \text{ éq. Alb.}$  ; b.  $\text{CholS}_{30}\text{GL3} / 250 \text{ éq. Alb.}$  ; c.  $\text{CholS}_{30}\text{GL3} / 250 \text{ éq. Alb.}$  (zoom)**

La concentration en albumine a ensuite été abaissée d'un facteur 100 (2, 5 éq.,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Dans ces conditions, les images obtenues pour les composés  $\text{CholS}_{30}\text{GL3}$  et  $(\text{C}_{12})_2\text{S}_{30}\text{GL3}$  ne montrent que la présence de protéines, toutefois beaucoup plus éparées que pour l'exemple donné en Figure 100-a (données non montrées). Deux structures de 50 nm apparaissent à nouveau pour le composé  $\text{C}_{12}\text{S}_{30}\text{GL3}$  (Figure 101-a) mais la très faible occurrence de ces particules et l'omniprésence d'ombres correspondant à de l'albumine (données non montrées) suggèrent que la majorité des siRNAs  $\text{C}_{12}\text{S}_{30}\text{GL3}$  sont toujours en interaction avec l'albumine. En revanche, en ce qui concerne le composé  $\text{S}_{30}\text{GL3}$ , l'interaction avec l'albumine semble complètement abolie. Les particules de 20 nm visibles sur la Figure 96-a sont de nouveau observables (Figure 101-b,c). Ces constatations soulignent que les parties lipidiques jouent un rôle essentiel dans l'interaction avec l'albumine. La présence de spermines permet également une interaction électrostatique avec la protéine pour un excès de 250 eq. molaires, mais celle-ci est moins forte que pour les siRNAs cationiques lipidiques, comme en atteste la réapparition de structures pour un excès réduit à 2,5 eq.



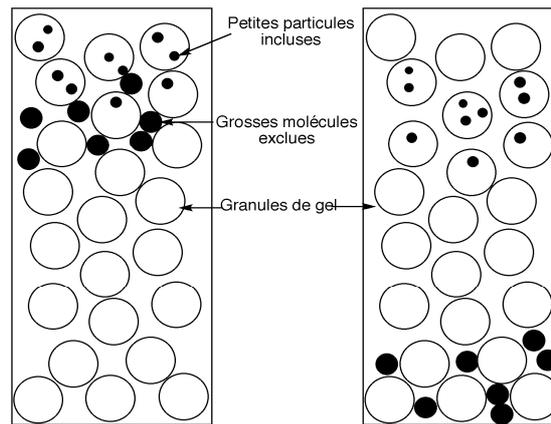
**Figure 101 : Images de MET en présence d'albumine ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).**

**a.  $\text{C}_{12}\text{S}_{30}\text{GL3} / 2,5 \text{ éq. Alb.}$  ; b.  $\text{S}_{30}\text{GL3} / 2,5 \text{ éq. Alb.}$  ; c.  $\text{S}_{30}\text{GL3} / 2,5 \text{ éq. Alb.}$  (zoom)**

D'autres essais ont été réalisés sans succès pour caractériser l'interaction entre l'albumine et nos siRNAs cationiques lipophiles : à l'aide d'un gel d'électrophorèse ou par filtration sur gel de protéines.

Dans le premier cas, la migration sur gel est effectuée de la même façon qu'indiqué p.133. Pour faciliter la visualisation, l'excès d'albumine par rapport aux siRNAs cationiques lipophiles a été abaissé à 10 équivalents molaires contre 250 auparavant et un marqueur de poids moléculaire est déposé dans l'un des puits. Cependant cette quantité d'albumine est encore trop élevée et l'on observe une large diffusion des bandes protéiques (révélation par technique UV et au bleu de coomassie). D'autre part, la contrainte de volume à déposer dans les puits du gel ( $20 \mu\text{L}$ ) force la concentration en siRNAs ( $200 \text{ pmol}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ) et en albumine ( $2 \text{ nmol}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ), ce qui aboutit à la formation d'un précipité lors de la préparation des échantillons. Le gel d'électrophorèse ne paraît alors pas adapté à l'observation de l'interaction entre albumine et siRNAs cationiques lipophiles dans les conditions utilisées en biologie cellulaire.

Une deuxième tentative pour caractériser l'interaction entre albumine et siRNAs lipophiles est basée sur une filtration sur gel par exclusion de taille. Cette méthode consiste à séparer les molécules selon leur taille : le support utilisé pour la filtration présente des pores de diamètre suffisamment petit pour que les grosses molécules ne puissent le traverser, et soient éluées directement en contournant les billes de support. Les petites molécules en revanche passent à l'intérieur des pores du support. Leur trajet est plus long, elles sont donc davantage retenues (Figure 102).



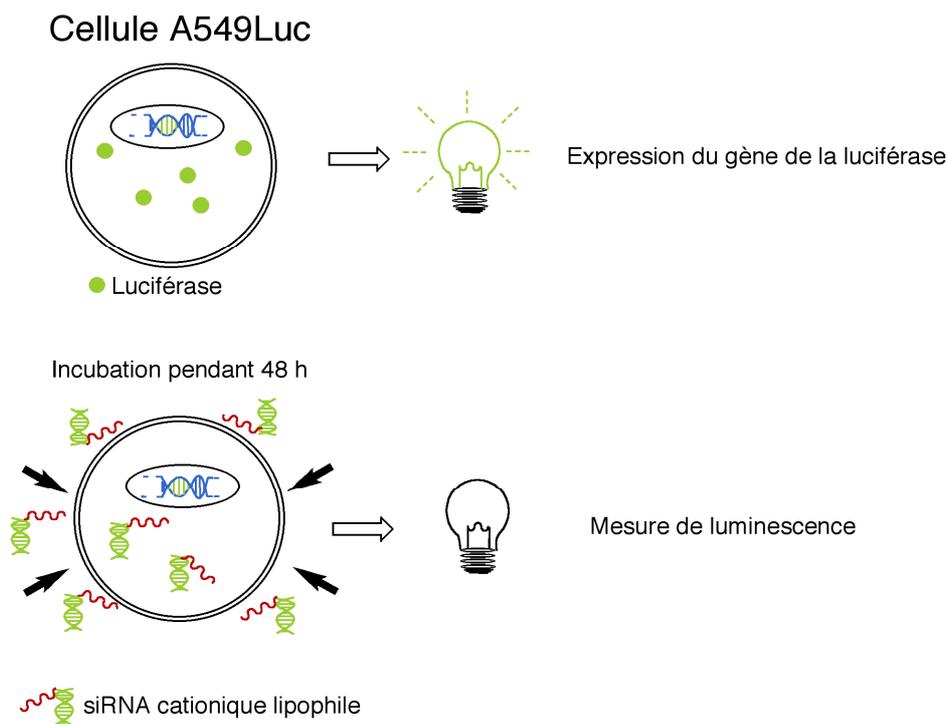
**Figure 102 : Principe de la chromatographie d'exclusion de taille**

Cette méthode a déjà été utilisée avec succès par Wolfrum et al. [160] pour quantifier l'interaction entre des siRNAs lipophiles et de l'albumine ou des lipoprotéines. Toutefois, dans leurs conditions expérimentales, ce sont les siRNAs qui sont mis en excès (4 M) par rapport à l'albumine et il n'est pas fait mention des quantités de siRNAs requises pour cette expérience. Or dans notre cas, nous disposons d'une faible quantité de siRNAs cationiques lipophiles. Les conditions de filtrations sur gel doivent être adaptées à une échelle beaucoup plus petite que les colonnes de filtration habituelles. De nombreux essais de mise au point ont été réalisés à l'aide d'albumine marquée à la cyanine (Cy5) et d'une protéine de poids moléculaire très proche des siRNAs, le chymotrypsinogène A (25 kDa) dans un rapport 1 :1. L'élution s'effectue à l'aide d'un tampon de force ionique 0,15 M, sur un support Sephacryl S200 (séparation de masses comprises entre 5 kDa et 250 kDa) contenu dans une colonne Pierce centrifuge (2 mL) pour des débits compris entre 0,07 mL.min<sup>-1</sup> et 0,1 mL. min<sup>-1</sup>. Les résultats montrent que la colonne utilisée n'est pas assez résolutive, puisqu'il n'y a pas séparation des deux pics, et qu'il y a une très forte dilution des échantillons. Cette méthode de caractérisation a donc été abandonnée.

#### **IV. ÉVALUATION DES siRNAs CATIONIQUES LIPOPHILES EN BIOLOGIE CELLULAIRE**

Le modèle employé *in vitro* pour caractériser l'efficacité des siRNAs cationiques a été précédemment décrit [203]. Les cellules A549Luc utilisées sont des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549) transformées afin d'exprimer de façon stable le

gène modifié de la luciférase de la luciole *Photinus Pyralis* : le gène GL3. La luciférase étant l'enzyme impliquée dans la luminescence de la luciole, lorsque l'on met en contact les protéines extraites de ces cellules recombinantes avec le substrat de la luciférase : la luciférine, on observe une apparition de luminescence à hauteur de  $1-2.10^{10}$  RLU/mg de protéine.



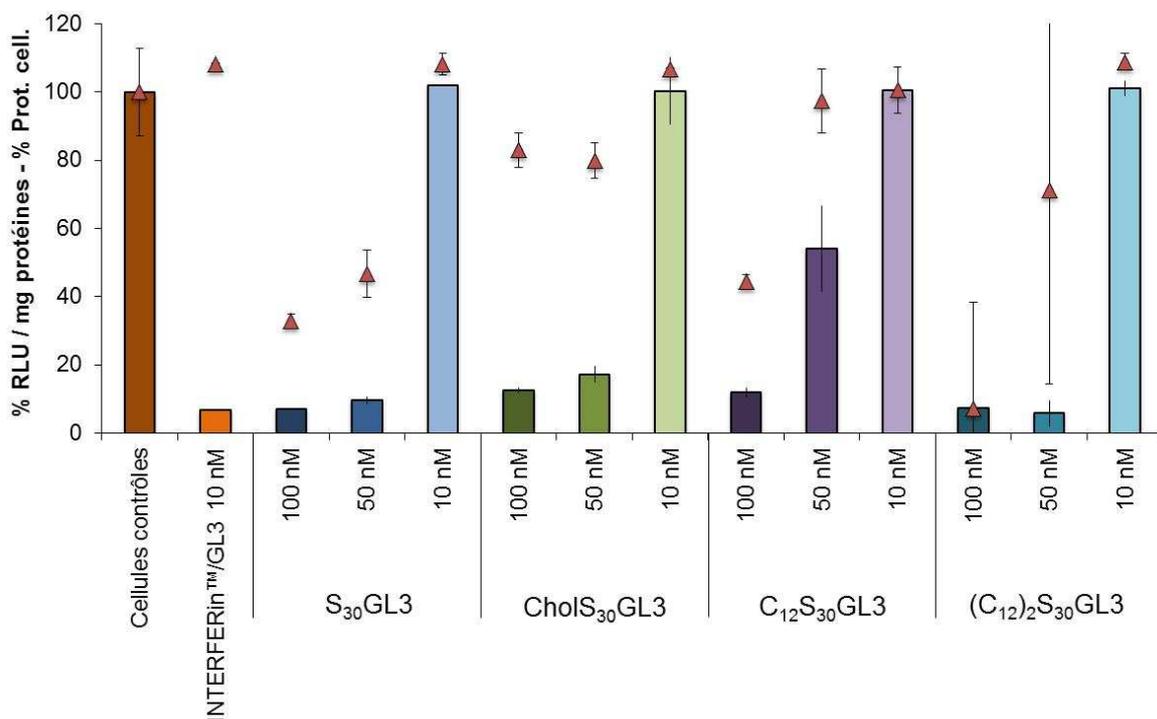
**Figure 103 : Principe d'évaluation de l'activité des siRNAs cationiques lipophiles**

L'efficacité des siRNAs à éteindre l'expression du gène ciblé a donc été quantifiée par mesure de luminescence 48 h après incubation avec les siRNAs. Leur toxicité a été évaluée par dosage des protéines cellulaires à t+48 h. Ce temps d'incubation correspond à l'efficacité optimale des siRNAs. À 24 h, l'extinction de l'expression du gène n'est pas idéale, soit parce qu'elle est affectée par des protéines résiduelles antérieures à la transfection soit parce que l'effet biologique n'est pas encore suffisant. À 72 h, l'effet biologique des siRNAs décroît. Les premières expériences réalisées en l'absence de sérum ont pour but d'établir la concentration efficace des nouveaux analogues cationiques lipophiles seuls, puis en présence de leur cargo moléculaire, l'albumine. Par la suite, souhaitant se rapprocher des conditions *in vivo*, des expériences similaires ont été menées en présence de sérum. En l'absence d'indication contraire, tous les siRNAs ont été déposés sur les cellules sans agent de transfection. En raison de la faible quantité de matériel disponible, chaque condition est effectuée en duplicat.

## A. Test de l'efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en l'absence de sérum

### 1. Efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en fonction de la concentration

Les premières expériences sont réalisées comme suit : les siRNAs sont déposés sur les cellules dans un milieu sans sérum. L'ajout de sérum n'intervient qu'au bout de 4 h d'incubation [203]. Des essais initiaux menés à des concentrations de 500 nM, 200 nM et 100 nM en siRNAs montrent une très forte toxicité aux deux premières valeurs (données non montrées). Les concentrations ont donc été abaissées à 100 nM, 50 nM et 10 nM (Figure 104).



**Figure 104 : Efficacité des siRNAs amphiphiles en l'absence de sérum**

L'expression de la luminescence est exprimée en pourcentage, la luminescence provenant des cellules contrôles étant considérées comme égale à 100%. Les résultats obtenus montrent que les siRNAs cationiques lipophiles sont capables d'entrer dans les cellules sans agent de transfection et ont tous une activité d'interférence comparable au siRNA cationique contrôle (S<sub>30</sub>GL3) aux mêmes concentrations ainsi qu'au siRNA nu 10 nM transfecté par le vecteur de référence, l'INTERFERin™. De façon plus détaillée, l'expression du gène de la luciférase est

éteinte de *ca* 90% pour des concentrations aussi faibles que 100 nM voire 50 nM (à l'exception de C<sub>12</sub>S<sub>30</sub>GL3), démontrant ainsi que la conjugaison à des parties lipidiques n'affectent pas l'efficacité des siRNAs résultants. Pour une concentration de 10 nM, l'activité de tous les siRNAs conjugués est abolie. En ce qui concerne la toxicité des composés testés, les siRNAs cationiques lipophiles arborent des cytotoxicités négligeables ou acceptables à 50 nM. Parmi ces trois composés, le siRNA conjugué au cholestérol présente une nette amélioration de la survie cellulaire par rapport à son homologue cationique.

Les siRNAs contrôles conjugués aux parties lipidiques : CholGL3, C<sub>12</sub>GL3 et (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>GL3 n'indiquent aucune activité d'interférence même pour des concentrations de l'ordre de 500 nM, mais sont capables d'éteindre l'expression du gène lorsqu'ils sont transfectés par l'INTERFERin™ (Figure 105). Ceci indique que les parties lipidiques seules ne permettent pas l'internalisation et la libération dans le cytoplasme des siRNAs aux concentrations testées.

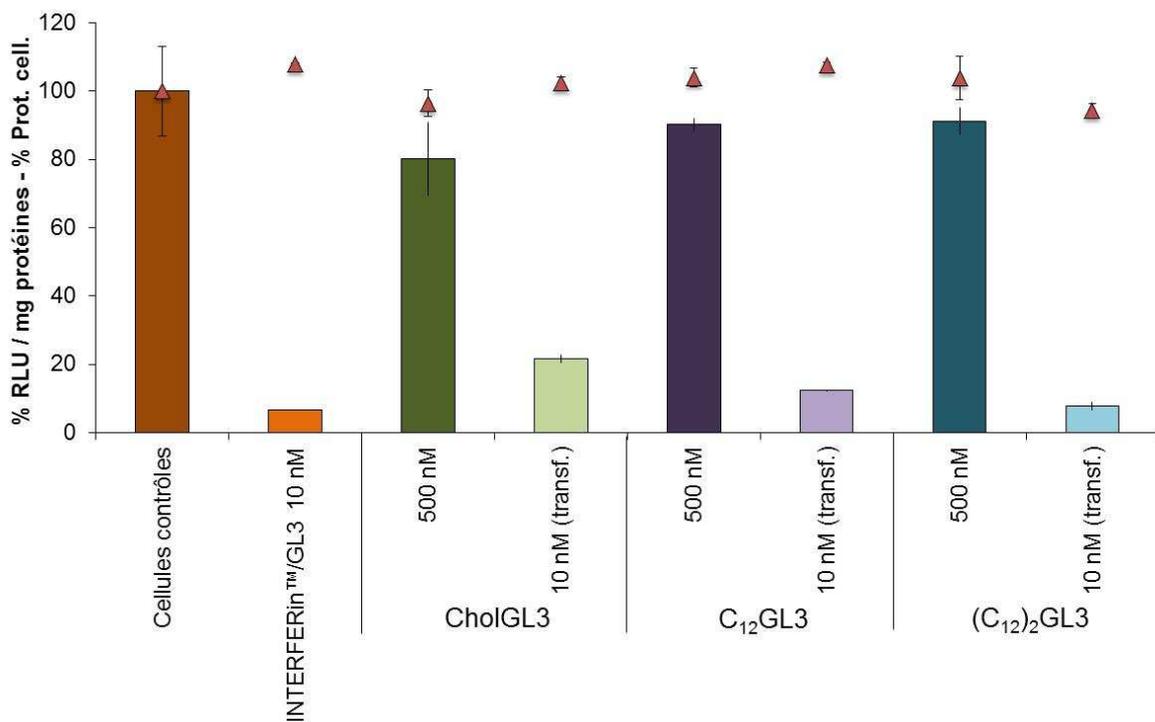


Figure 105 : Efficacité des siRNAs témoins seuls et transfectés par de l'INTERFERin™

## 2. Efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en présence d'albumine

Afin de tester l'albumine en tant que cargo moléculaire, les siRNAs cationiques lipophiles ont été pré-incubés pendant 30 min avec une solution d'albumine à 10 mg.mL<sup>-1</sup> (250 à

500 équivalents molaires) avant d'être déposés sur les cellules. Comme précédemment, l'ajout de sérum n'intervient qu'au bout de 4 h d'incubation. On observe ensuite si la présence d'albumine a une incidence sur l'efficacité des siRNAs cationiques lipophiles.

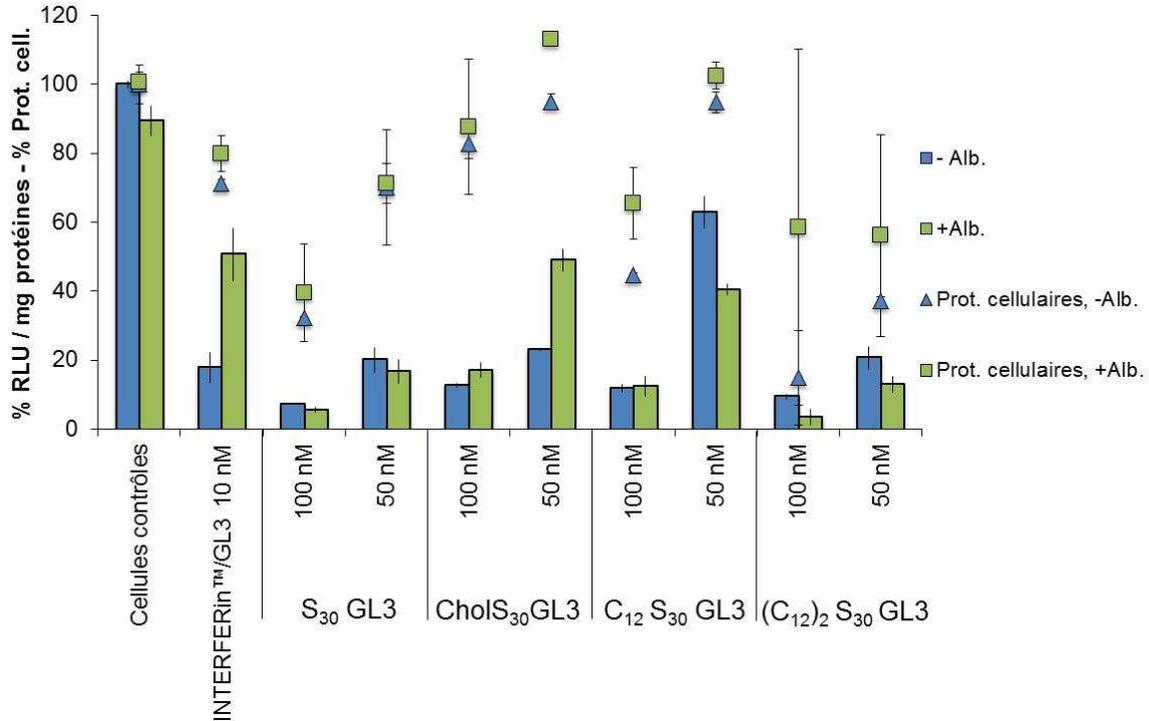


Figure 106 : Comparaison des activités des siRNAs avec et sans albumine

La comparaison entre les résultats obtenus avec et sans albumine montre que la présence d'albumine n'a pas d'impact sur l'efficacité des siRNAs cationiques lipophiles et semble même avoir un effet positif sur la survie cellulaire (Figure 106). Seule la vectorisation par l'agent de transfection INTERFERin™ semble perturbée par la présence d'albumine. Toutefois, afin d'être le plus homogène possible avec les autres échantillons, la quantité nécessaire de siRNAs GL3 ( $C_{finale} = 10 \text{ nM}$ ) a d'abord été complexée par l'INTERFERin™ en milieu beaucoup plus concentré que lors de la réalisation de cet échantillon sans albumine, avant d'être diluée et pré-incubée avec l'albumine. Ce changement de protocole peut aussi être à l'origine de la moins bonne efficacité observée. La pré-incubation des siRNAs contrôles CholGL3, C<sub>12</sub>GL3, (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>GL3 avec de l'albumine en revanche n'a pas permis d'éteindre l'expression du gène de la luciférase à une concentration de 100 nM (Figure 107).

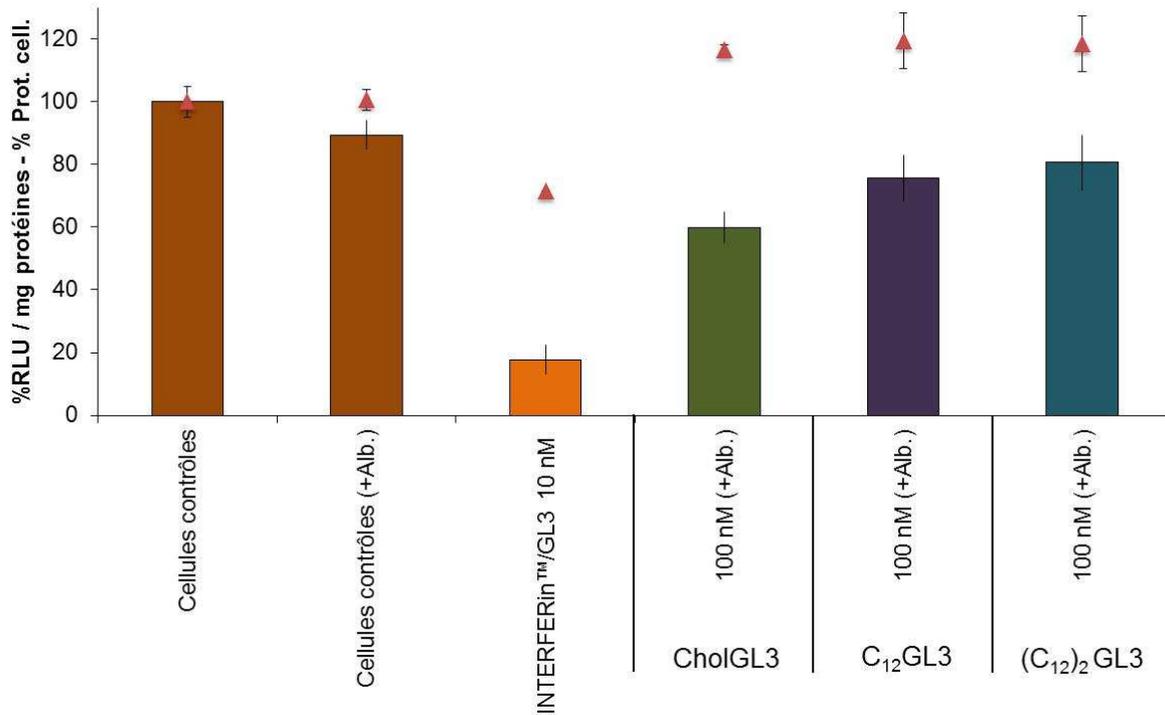


Figure 107 : Efficacité des siRNAs témoins en présence d'albumine

## B. Test de l'efficacité des siRNAs cationiques lipophiles en présence de sérum

L'efficacité des oligonucléotides seuls et pré-incubés avec de l'albumine a été testée en présence de sérum (Figure 108). De façon surprenante, les siRNAs cationiques lipophiles seuls, ainsi que leur contrôle siRNAs cationiques sont toujours capables d'éteindre l'expression du gène de la luciférase d'environ 90% pour des concentrations à peu près deux fois supérieures seulement à celles utilisées en absence de sérum : 100 nM pour (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>GL3 et S<sub>30</sub>GL3 et 200 nM pour CholS<sub>30</sub>GL3 et C<sub>12</sub>S<sub>30</sub>GL3. Ces résultats sont extrêmement intéressants dans la mesure où les siRNAs ont été synthétisés avec un squelette ARN naturel pour préserver leur activité biologique. Ils sont donc particulièrement sensibles aux nucléases présentes dans le sérum et devraient normalement être dégradés en quelques minutes [162]. Ce gain de stabilité peut provenir des propriétés d'auto-assemblages en structures nanométriques des siRNAs cationiques et cationiques lipophiles précédemment rapportées, ou bien au repliement de la chaîne spermine dans le sillon du siRNA double brin. Les cytotoxicités en présence de sérum sont drastiquement réduites, ce phénomène semble globalement accentué par la présence d'albumine. Seul le composé (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>GL3 conserve

une toxicité relativement élevée (75% sans albumine), quoique peut-être abaissée par rapport aux expériences sans sérum. Comme précédemment, l'albumine n'a aucun effet flagrant sur l'efficacité des siRNAs cationiques lipophiles. En revanche elle semble toujours déstabiliser la complexation entre le vecteur INTERFERin™ et le siRNA, avec les mêmes réserves sur cette remarque que celles déjà évoquées p.146.

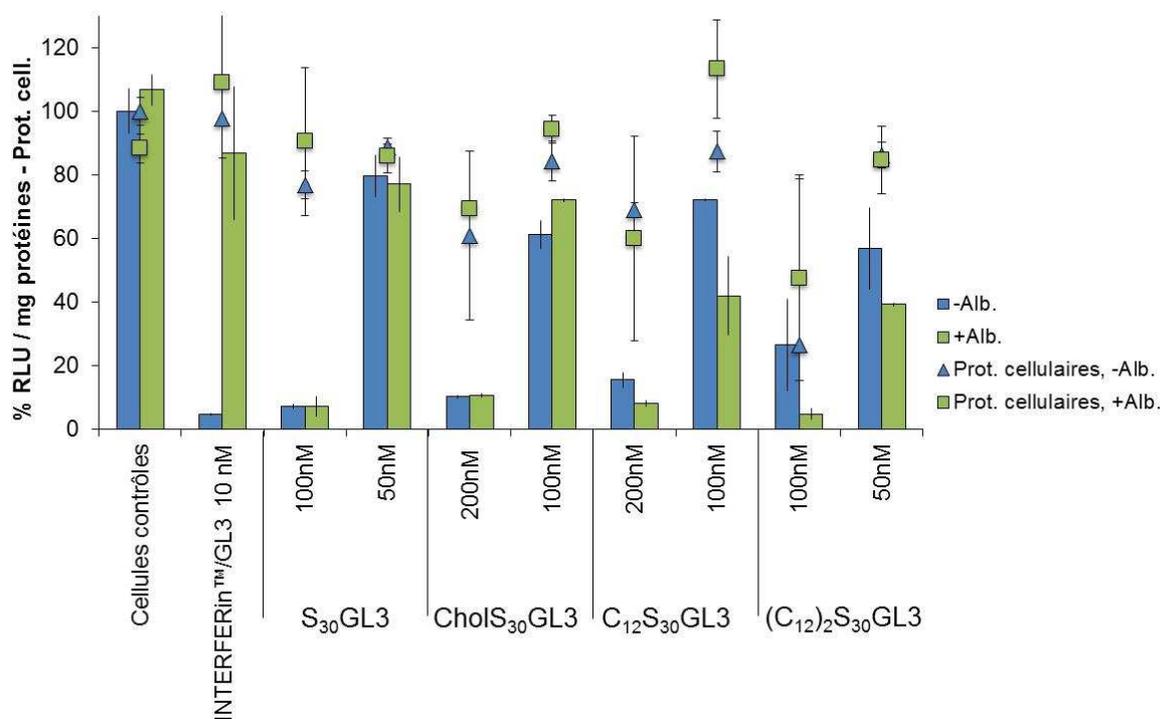


Figure 108 : Efficacité des siRNAs pré-incubés ou non sur l'albumine, en présence de sérum

## V. CONCLUSION

En conclusion, nous avons réussi à synthétiser des analogues lipidiques de nos siRNAs cationiques. Ces siRNAs ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par gel d'électrophorèse. Pour la première fois, les siRNAs cationiques et leurs homologues lipidiques ont été observés en microscopie électronique en transmission. Les images obtenues montrent la capacité de ces siRNAs à se présenter sous forme de molécules isolées ou à s'auto-arranger en structures nanométriques distinctes selon la nature de la partie conjuguée. L'étude *in vitro* de l'activité de ces nouveaux siRNAs sur des cellules modèles A549Luc révèle une efficacité d'interférence similaire à celle du siRNA cationique témoin (S<sub>30</sub>GL3)

précédemment développé dans le laboratoire [203]. Pour la première fois également, nous avons démontré la résistance et l'efficacité de nos siRNAs conjugués en présence de sérum, pour des concentrations en acides nucléiques comprises entre 100 nM et 200 nM. Cette observation est particulièrement prometteuse pour la poursuite des travaux dans un contexte *in vivo*. Cette stabilité en présence des nucléases du sérum pourrait être imputable aux propriétés d'auto-agencement des siRNAs conjugués observées en MET, ou au repliement de la partie polyspermine dans le sillon de l'oligonucléotide double brin. Les parties lipidiques ajoutées comme « ancrs moléculaires » n'affectent pas l'activité des siRNAs cationiques correspondants et comme prévu, s'avèrent particulièrement importantes pour améliorer l'interaction entre le cargo moléculaire envisagé : l'albumine et le siRNA cationique. En outre, la pré-incubation des différents siRNAs cationiques lipophiles avec de l'albumine ne détériore pas leur activité. Dans la mesure où nos conditions expérimentales se rapprochent le plus possible des conditions *in vivo*, avec notamment la présence de sérum, une étude sur modèle murin par injection par intraveineuse de nos siRNAs cationiques lipophiles pré-chargés sur de l'albumine devrait prouver la pertinence de notre approche. On suppose en effet que la résistance de nos siRNAs à la dégradation par les nucléases et leur diffusion dans l'organisme en seront grandement améliorées. D'autres lipoprotéines pourraient également être testées en tant que « transporteurs » de siRNAs cationiques lipophiles.

# Conclusion générale et perspectives



Nous avons vu dans un premier chapitre, qu'avec l'évolution des connaissances des mécanismes qui gouvernent l'expression génétique, il est possible de réduire la taille des acides nucléiques thérapeutiques du gène à l'oligonucléotide. En conséquence, la taille des vecteurs synthétiques utilisés pour les acheminer vers leur site d'action peut également être réduite de la particule, vers des molécules isolées, avec la conjugaison covalente sur les oligonucléotides de résidus responsables de leur internalisation cellulaire. Cette approche, actuellement à l'étude au laboratoire de chimie génétique, a abouti en une première génération d'oligonucléotides couplés à des polyamines, synthétisés automatiquement par la chimie des phosphoramidites. Ces conjugués ont montré des résultats prometteurs tant pour des applications diagnostiques, que dans une optique thérapeutique.

Dans un deuxième chapitre, nous avons développé une nouvelle chimie de conjugaison des acides nucléiques à des polyspermines, en remplaçant le lien phosphate inter-spermine par un groupement guanidine. À cet effet, un nouveau synthon spermine a donc été synthétisé en huit étapes pour un rendement global de 24%. Ces spermines ont d'abord été oligomérisées sur support solide avant d'être couplées à l'extrémité 3' d'un oligonucléotide. En pratique, jusqu'à 3 spermines ont pu être couplées à l'aide d'un support dT-CPG amino-modifié. Les oligonucléotides conjugués résultants  $[N]_{10}GS_1$ ,  $[N]_{10}GS_2$ ,  $[N]_{10}GS_3$  ont été caractérisés par spectrométrie de masse et leurs propriétés physico-chimiques étudiées. La mesure de leur température de fusion montre une affinité accrue de ces composés pour leur séquence cible et donc une stabilisation des duplex correspondants dans des conditions salines physiologiques. En perspective, il serait intéressant de vérifier la spécificité de nos oligonucléotides en mesurant leurs affinités pour un oligonucléotide présentant un ou plusieurs mésappariements. Il serait envisageable de tester également leur capacité de pénétration cellulaire.

En ce qui concerne l'amélioration de la qualité et du rendement de tels conjugués, plusieurs axes de recherche peuvent être envisagés : substituer le lien succinyl, partiellement clivable en présence d'une solution de DBU, par un lien sarcosyl-succinyl ; remplacer la jonction phosphoramidate entre les spermines et l'oligonucléotide, sensibles aux conditions acides, par un lien phosphate ; modifier le synthon de façon à améliorer sa diffusion sur support solide et sa réactivité, en remplaçant, par exemple, les groupements Npeoc par des groupements protecteurs moins encombrants.

Certaines de ces approches ont été testées : ainsi un support synthétisé avec un lien sarcosyl-succinyl s'avère parfaitement résistant au clivage par une solution de DBU 1 M pendant 19 h 30. De même, grâce à la synthèse d'une molécule de liaison **12**, une fonction alcool a pu être introduite avec un excellent rendement, pour la formation d'un groupement phosphate entre oligonucléotide et spermines.

Le deuxième axe de ma thèse a consisté à synthétiser ou tester les oligonucléotides-polyspermines de première génération dans une optique thérapeutique. Dans le chapitre 3, des oligonucléotides antisens ont été réalisés avec des modifications 2'-OMe phosphorothioates de façon à augmenter leur stabilité face à une dégradation par des nucléases, puis couplés à un nombre variable de spermines ( $n = 15, 20, 25$  ou  $30$ ). Ces oligonucléotides ciblent le site d'épissage aberrant de l'intron 2 de la  $\beta$ -globine humaine. Un test de pénétration cellulaire effectué avec un oligonucléotide  $S_{20}$ [ON-705] montre que cet oligonucléotide cationique est capable de transfection en moins de 4 h. Les résultats obtenus *in vitro* sur un modèle de gène rapporteur montrent que le ratio efficacité/cytotoxicité est optimal pour un nombre de 20 spermines pour des concentrations submicromolaires. La restauration de l'expression du gène rapporteur atteint au maximum à 23 fois l'expression basale. Une étude cinétique indique d'autre part que ce rétablissement de l'expression génétique est encore effectif après 5 jours d'incubation.

Dans notre dernière étude, trois lipides différents : le cholestérol et une ou deux chaînes carbonées de 12 carbones ont été conjugués à des siRNAs cationiques. Ces parties lipidiques doivent permettre une pré-association des siRNAs avec une protéine sérique, l'albumine, de façon à former des cargos moléculaires furtifs. En l'absence d'albumine, ces composés sont capables de s'auto-assembler en particules nanométriques ou sous forme de micelles. En revanche, ces structures disparaissent lorsque les composés sont mis en présence d'albumine à la concentration testée en biologie cellulaire : les siRNAs cationiques lipophiles interagissent probablement avec l'albumine. En réduisant la concentration en albumine d'un facteur 100, les particules nanométriques observées pour le siRNA témoin  $S_{30}$ GL3 seul réapparaissent : il n'y a plus ou peu d'interaction avec l'albumine à cette concentration, alors que les autres composés semblent toujours associés à l'albumine. Ceci indique que la partie polyaminée permet également une interaction avec l'albumine, chargée négativement, mais que les résidus lipidiques sont essentiels pour maintenir une interaction forte.

Une étude préliminaire *in vitro* de ces trois nouveaux siRNAs cationiques lipophiles a montré que leur activité d'extinction de l'expression génétique est similaire à celle du siRNA témoin S<sub>30</sub>GL3 (50 nM à 100 nM) et que cette activité n'est pas diminuée par pré-association avec de l'albumine. En outre, des tests effectués pour la première fois **en présence de sérum**, se sont avérés très prometteurs pour une application *in vivo*, puisque les siRNAs cationiques et ses homologues lipophiles présentent tous une très bonne stabilité aux nucléases et sont efficaces pour des concentrations seulement deux fois plus élevées qu'en l'absence de sérum. Dans ces conditions, les siRNAs testés présentent, de plus, une cytotoxicité acceptable voire négligeable à l'exception du composé (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>GL3. La présence d'albumine semble avoir globalement pour effet de réduire ces toxicités. Les résultats préliminaires obtenus *in vitro* sont très favorables à une utilisation *in vivo*. Rien ne s'oppose donc à tester leurs performances sur un modèle murin, en injection systémique, en les pré-associant avec de l'albumine.



# Matériel et méthodes



## I. INDICATIONS GENERALES

### A. Solvants et produits chimiques

Tous les réactifs de synthèse organique ont été fournis soit par la société Sigma-Aldrich (Lyon, France), soit par la société TCI Europe (Zwijndrecht, Belgique), soit par la société Merck (Merck, Fontenay-sous-bois, France) et exploités pour les synthèses sans purification préalable. Les solvants utilisés proviennent tous de l'entreprise Carlo Erba-SDS (Val de Reuil, France) ou VWR-Prolabo (Merck). La distillation des solvants (dichlorométhane, acétonitrile) a été effectuée en présence d'hydrure de calcium. Les solvants distillés ainsi obtenus ont été séchés une nuit sur tamis moléculaire (3 Å, Sigma-Aldrich). La distillation de la triéthylamine a été effectuée sur KOH. La triéthylamine ainsi obtenue a été séchée une nuit sur KOH.

### B. Point de fusion

Les points de fusion sont mesurés sur un appareil de mesure de point de fusion Stuart SMP2 scientifique et ne sont pas corrigés. Chaque point de fusion est donné avec une incertitude de  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

### C. Résonance magnétique nucléaire (RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ )

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été réalisés sur des spectromètres Bruker DPX 200 MHz ou 300 MHz (sonde dual  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) ou sur un spectromètre Bruker Avance III 400MHz avec une sonde BBFO+ (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) et sont calculés par rapport à une référence interne (signal résiduel du solvant deutéré utilisé). Les multiplicité et forme des signaux sont décrites par les abréviations suivantes : br : broad (pic large), s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, quintuplet et m : multiplet. Chaque signal RMN est donné dans l'ordre suivant : déplacement chimique, forme du pic

(lorsque nécessaire), multiplicité, degré de substitution du carbone (DEPT, J-mod), intégration, attribution. Lorsque cela s'est avéré nécessaire l'attribution des carbones a été réalisée grâce à l'interprétation de spectres HSQC. En raison de la présence de groupements carbamates et trifluoroacétyles sur la plupart des molécules synthétisées, les signaux de certains carbones sont divisés en plusieurs pics (notation : pic démultiplié). Ceci est dû à la présence de différents isomères.

#### D. Spectrométrie de masse

Les spectres de masses des molécules organiques ont été réalisés par Pascale Buisine et Patrick Wehrung en mode d'ionisation positive, soit sur un spectromètre LC-MS : Agilent-1200 (LC) MM-ESI-APCI-MSD (MS) (Agilent, Massy, France), soit sur un spectromètre HRMS Bruker Daltonics (Ion Trap, HCT Ultra, ESI), soit sur un spectromètre MS Agilent (QTof 6520, ESI). Les oligonucléotides ont été caractérisés par spectrométrie de masse par Jean Marc Strub et Patrick Wehrung. Les spectres MALDI-TOF ont été obtenus en mode d'ionisation positif en utilisant un appareil Bruker Daltonics UltraFlex à l'aide d'une matrice d'acide hydroxypicolinique combinée avec du citrate de diammonium. Les spectres de masse HRMS-ESI ont été réalisés en mode d'ionisation négatif sur un appareil Bruker Daltonics HCT ultra.

#### E. Spectroscopie IR

Les spectres IR ont été effectués sur un appareil Nicolet 380 FT-IR à l'aide d'un module Smart Orbit ATR Sampling Accessory (ThermoFischer, Illkirch, France).

#### F. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires (C, H, N) ont été accomplies par le Service Central d'Analyse du CNRS USR-59 (Solaize) sur des microanalyseurs à détection avec catharomètre. La précision des mesures est de  $\pm 0,30\%$ .

## G. Spectroscopie UV-visible et mesure des températures de fusion

Les spectres d'absorption UV-visible et la mesure des températures de fusion ont été exécutés sur un spectrophotomètre Cary 100 (Varian, Les Ulis, France) à l'aide du logiciel Cary Win UV (modules : Scan, simple reads, thermal). Pour les mesures de  $T_m$ , cet appareil est équipé d'un passeur de cuves Cary Thermostatable Multicell Holder accessory (Varian) et d'un système de régulation de la température par effet Peltier Cary Temperature controller (Varian).

## H. Méthodes chromatographiques

Les analyses par CCM sont réalisées sur plaque de silice 60 F<sub>254</sub> (Merck). Outre l'observation par lumière UV à 254 nm, les révélateurs suivants ont été employés pour faciliter l'interprétation des CCM : une solution de PMA 5% dans l'éthanol et de la ninhydrine à 5% dans l'éthanol. Les séparations par colonnes chromatographiques ont été effectuées sur gel de silice 40-63  $\mu\text{m}$  (Merck). Les analyses par chromatographie en phase liquide à haute performance ont été mises en œuvre soit sur une chaîne HPLC HP 1100 series (Agilent) soit sur une chaîne HPLC Gilson comprenant un injecteur d'échantillon (232 XL), une pompe à seringue 402, une interface GSIOC 506C, une pompe 321, un détecteur UV-visible 155, un collecteur de fraction FC 203B. L'ensemble des appareils est contrôlé à l'aide d'un logiciel Trilution LC. La colonne utilisée pour analyses est une colonne échangeuse d'ions DNAPac PA100 4 x 250 mm (Dionex, Voisins le Bretonneux, France). Les purifications par HPLC sont effectuées sur la chaîne HPLC Gilson, en ayant recours à une colonne semi-prep DNAPac PA100 (9 x 250 mm, Dionex). Toutes les solutions salines employées sont préparés dans de l'eau mQ et filtrées sur membrane de cellulose (47 mm, 0,45 mm, Interchim, Montluçon, France).

## I. Microscopie Électronique à Transmission d'électrons (MET)

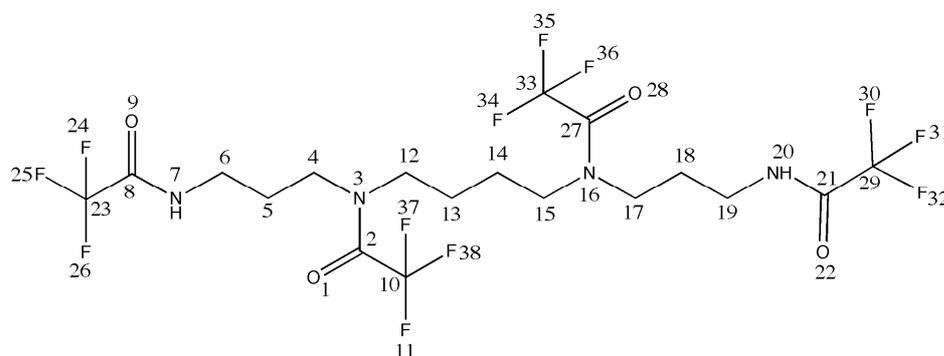
Les expériences de MET ont été réalisées par Emmanuelle Morin et Jean-Serge Remy sur un appareil Philips CM 120 (Philips, Suresnes, France).

## J. Synthèse d'oligonucléotides

Les réactifs pour la synthèse d'oligonucléotides ADN et ARN ainsi que les cartouches de purification Glen Pak RNA, Glen Pak DNA et PolyPak II proviennent tous de la société Glen Research/Eurogentec (Angers, France) à l'exception de l'acétonitrile de lavage externe qui a été fourni par l'entreprise Carlo Erba-SDS. Les oligonucléotides ont été produits sur un synthétiseur d'oligonucléotide Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System à l'aide du logiciel Expedite Workstation (GMI Inc., États-unis). Le DMT-spermine phosphoramidite a été synthétisé selon une procédure publiée et précipité dans le pentane [204].

## II. SYNTHÈSE ORGANIQUE EN SOLUTION

### A. Synthèse de la $N^1, N^2, N^3, N^4$ -tétra-TFA-spermine (1)



$$C_{18}H_{22}F_{12}N_4O_4$$

$$586,37 \text{ g.mol}^{-1}$$

Huile incolore /  
Poudre blanche  
(produit salin)

### MODE OPERATOIRE

De la spermine (10,0 g, 50 mmol) et du DMAP (37,2 g, 300 mmol, 6 éq.) dissous dans du DCM (200 mL) sont mis sous agitation sous argon, et refroidis à 0°C. De l'anhydride trifluoroacétique (52,3 g 250 mmol, 5 éq./1,2 eq. par rapport à l'amine) en solution dans du DCM (150 mL) sont ajoutés lentement au milieu réactionnel pendant 1 h 30. À la fin de l'addition, le bain de glace est ôté et le milieu réactionnel est laissé 5 h 30 sous agitation. Au cours de la réaction, un précipité blanc se forme. De l'eau distillée (350 mL) est ensuite ajoutée au milieu réactionnel. Le sel blanc se dissout. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du DCM (2 x 200 mL). La phase organique est séchée pendant

15 min sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. Après filtration et évaporation du solvant, le produit brut (huile incolore, m = 39,4 g) contenant de la DMAP résiduelle est utilisé tel quel pour la synthèse de **2**. Le produit pur peut être obtenu par recristallisation en chauffant dans de l'éthanol. Puis de l'acide chlorhydrique 37% est ajouté et le mélange est refroidi à 0°C. Le produit est filtré et lavé avec de l'eau. La poudre blanche obtenue, séchée une nuit sous vide est utilisée pour analyses.

## ANALYSES

**Point de fusion** : 114°C.

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz)** : δ 9,51-9,41 (dt,  $J_1 = 28,4$  Hz,  $J_2 = 5,6$  Hz, 2H, **H-7**, **H-20**), 3,40-3,36 (br m, 8H, **H-4**, **H-6**, **H-17**, **H-19**), 3,25-3,18 (m, 4H, **H-12**, **H-15**), 1,86-1,72 (m, 4H, **H-5**, **H-18**), 1,63-1,43 (br m, 4H, **H-13**, **H-14**).

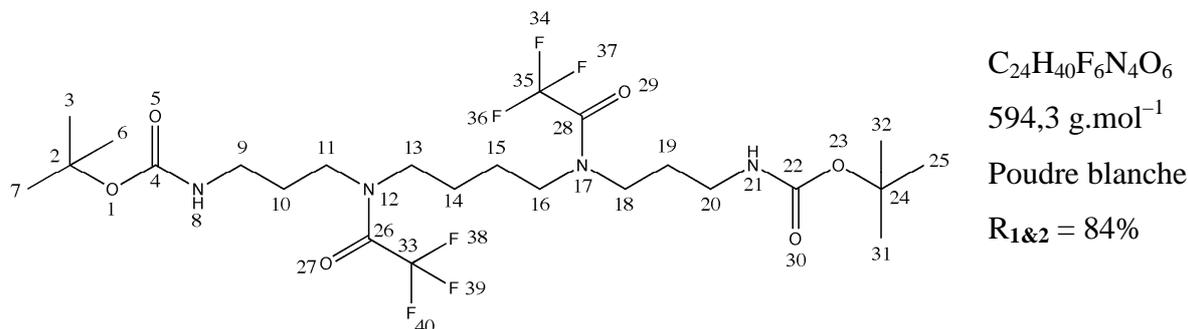
**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, 400 MHz)** : δ 156,13-156,01, 155,76-155,65 (pics démultipliés, 2C, **C-2**, **C-27**), 155,21, 154,86 (2C, **C-8**, **C-21**), 120,16-119,77, 117,30-116,88, 114,43-114,02, 111,57-111,17 (pics démultipliés, 4C, **C-10**, **C-23**, **C-29**, **C-33**), 46,81-46,70, 46,06-45,88, 44,69-44,64, 44,24 (pics démultipliés, 4C, **C-4**, **C-17**, **C-6**, **C-19**) 36,87, 36,45 (2C, **C-12**, **C-15**), 27,74, 25,83 (2C, **C-5**, **C-18**), 25,43-25,15, 23,56-23,34 (pics démultipliés, 2C, **C-13**, **C-14**).

**RMN <sup>13</sup>C DEPT (DMSO, 200 MHz)** : δ 46,77, 46,06-45,88 (pic démultiplié), 44,67, 44,24 (CH<sub>2</sub>, 4C, **C-4**, **C-17**, **C-6**, **C-19**), 36,87, 36,45 (CH<sub>2</sub>, 2C, **C-12**, **C-15**), 27,74, 25,83 (CH<sub>2</sub>, 2C, **C-5**, **C-18**), 25,43-25,15, 23,56-23,34 (pics démultipliés, CH<sub>2</sub>, 2C, **C-13**, **C-14**).

**MS (LC-MS)** :  $m/z$  calculée: 586,1, trouvée: 587,0 [M+H]<sup>+</sup>.

**IR** : ν = 3318 (N-H, moyenne), ν = 1735 (C=O, **C-8**, **C-21**, fine et forte), ν = 1678 (C=O, **C-2**, **C-27**, forte) cm<sup>-1</sup>.

## B. Synthèse de la $N^1, N^4$ -bis-Boc- $N^2, N^3$ -bis-TFA-spermine (**2**)



### MODE OPERATOIRE

À un mélange de spermine tétraprotégée **1** (39,4 g, 50 mmol, 1 éq.) et de DMAP (12,4 g, 100 mmol, 2 éq.) mis en suspension dans du DCM (180 mL) est ajouté goutte-à-goutte du dicarbonate de di-tert-butyle (33,7 g 150 mmol, 3 éq.) dans du DCM (100 mL). Au cours de la réaction, un dégagement gazeux est observé et la poudre blanche se solubilise. La réaction est laissée sous agitation une nuit à température ambiante. Une solution aqueuse de  $NH_4Cl$  1 M (200 mL) est ajoutée puis les phases sont séparées et la phase organique est lavée avec une solution de  $NH_4Cl$  1 M (2 x 200 mL). La phase organique est ensuite séchée 15 min sur  $MgSO_4$  anhydre, filtrée et évaporée. Du MeOH (60 mL) est ajouté au produit brut et le mélange est mis sous agitation. Au bout de quelques instants, un précipité se forme. Ce précipité est ensuite recristallisé dans le MeOH en chauffant à 60°C brièvement, jusqu'à dissolution du produit puis refroidi 1 h à 4°C, filtré et lavé avec du MeOH froid. La poudre blanche résultante est séchée une nuit sous vide (24,4 g,  $R_{1\&2} = 84\%$ ).

### ANALYSES

**Point de fusion :** 141°C.

**RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  5,01, 4,79 (br, 2H, **H-8**, **H-21**), 3,40-3,34 (br m, 8H, **H-11**, **H-13**, **H-16**, **H-18**), 3,12-3,05 (m, 4H, **H-9**, **H-20**), 1,79-1,68 (m, 4H, **H-10**, **H-19**), 1,56-1,54 (br m, 4H, **H-14**, **H-15**), 1,381 (s, 18H, **H-3**, **H-6**, **H-7**, **H-25**, **H-31**, **H-32**).

**RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  157,39-157,33, 157,2-157,17, 157,03-156,98, 156,85-156,82 (pics démultipliés, 2C, **C-26**, **C-28**), 156,24 (2C, **C-4**, **C-22**), 120,89, 118,05,

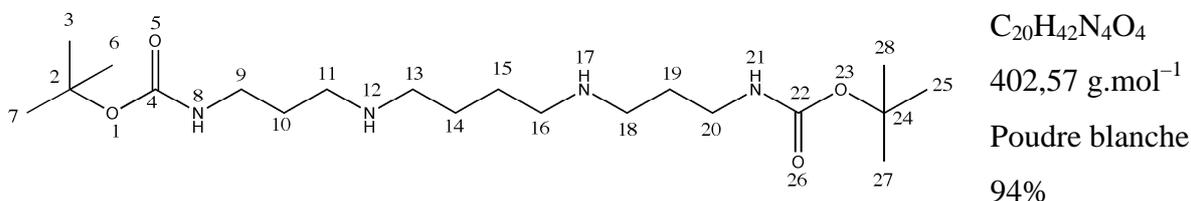
115,19, 112,31 (2C, **C-35**, **C-33**), 79,70-79,60, 79,42-79,34 (pics démultipliés, 2C, **C-2**, **C-24**), 47,15, 46,43-46,36, 45,49, 44,43-44,38 (pics démultipliés, 4C, **C-13**, **C-16**, **C-11**, **C-18**), 37,91-37,67 (pic démultiplié, 2C, **C-9**, **C-20**), 29,90-29,76, 27,65-27,58 (pics démultipliés, 2C, **C-10**, **C-19**), 28,51-28,45 (pic démultiplié, 6C, **C-3**, **C-6**, **C-7**, **C-25**, **C-31**, **C-32**), 25,99-25,92, 24,15-24,06 (pics démultipliés 2C, **C-14**, **C-15**).

**MS (LC-MS) :**  $m/z$  : calculée : 594,3, trouvée : 617,2  $[M+Na]^+$ .

**IR :**  $\nu = 3345$  (N-H, moyenne),  $\nu = 1693$  (C=O, **C-4**, **C-22**, fine et forte),  $\nu = 1676$  (C=O, **C-26**, **C-28**, fine et très forte)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Analyse élémentaire :** calculée pour  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_6$  : C : 48,48%, H : 6,78%, N : 9,42% ; trouvée : C : 48,35%, H : 6,87%, N : 9,25%.

### C. Synthèse de la $N^1, N^4$ -bis-Boc-spermine (**3**)



#### MODE OPERATOIRE

La spermine tétraprotégée **2** (24,4 g, 41 mmol, 1 éq.) est mise en suspension sous agitation dans du MeOH (130 mL). De la soude (16,6 g, 415 mmol, 10 éq.) dissoute dans de l'eau distillée (40 mL) est ajoutée à température ambiante et la réaction est laissée une nuit sous agitation. Le jour suivant, le milieu réactionnel est concentré au tiers de son volume initial et complété par une solution aqueuse de NaOH 1 M (65 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM (3 x 150 mL), séchée 15 min sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée et réduite par évaporation. Le produit pur, une poudre blanche, est obtenu par reprecipitation dans l'heptane (200 mL) puis séché une nuit sous vide ( $m = 15,5 \text{ g}$ ,  $R = 94\%$ ).

## ANALYSES

Point de fusion : 94°C.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  5,16 (br, 2H, H-8, H-21), 3,20-3,14 (q,  $J = 8$  Hz, 4H, H-9, H-20), 2,66-2,62 (t,  $J = 8,8$  Hz, 4H, H-11, 18), 2,60-2,56 (t,  $J = 8$  Hz, 4H, H-13, H-16), 1,66-1,57 (quintuplet,  $J = 8,8$  Hz, 4H, H-10, H-19), 1,52-1,48 (br m, 4H, H-14, H-15), 1,41 (s, 18H, H-3, H-6, H-7, H-25, H-27, H-28).

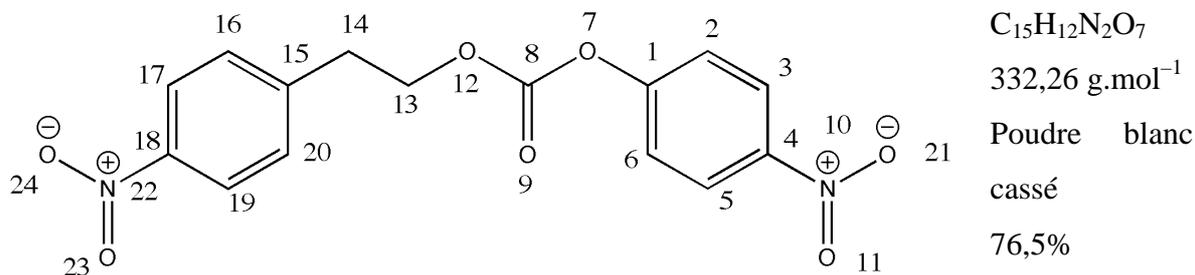
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :  $\delta$  156,21 (2C, C-4, C-22), 78,90 (2C, C-2, C-24), 49,78 (2C, C-11, C-18), 47,72 (2C, C-13, C-16), 39,24 (2C, C-9, C-20), 29,97 (2C, C-10, C-19), 28,52 (6C, C-3, C-6, C-7, C-25, C-27, C-28), 27,87 (2C, C-14, C-15).

MS (LC-MS) :  $m/z$  calculée : 402,3, trouvée : 403,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

IR :  $\nu = 3335$  (N-H, faible),  $\nu = 1693$  (C=O, forte)  $\text{cm}^{-1}$ .

Analyse élémentaire : calculée pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$  : C : 59,67%, H : 10,52%, N : 13,92% ; trouvée : C : 59,53%, H : 10,44%, N : 13,76%.

## D. Synthèse du 4-nitrophénéthyl 4-nitrophényl carbonate (4)



## MODE OPERATOIRE

Du chloroformiate de 4-nitrophényle (21,8 g, 105 mmol, 1,05 éq.) dissous sous agitation dans du DCM (140 mL) est refroidi à 0°C. Un mélange de 4-nitrophénéthyl alcool (16,9 g,

100 mmol, 1 éq.) et de pyridine (8,8 g, 9 mL, 111 mmol, 1,1 éq.) dissous dans du DCM (60 mL) est ajouté goutte-à-goutte à 0°C pendant 2 h. Le bain de glace est ôté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation jusqu'à ce que tout le 4-nitrophényl alcool soit consommé (suivi CCM, éluant : AcOEt : CyH 1 : 1 Rf = 0,4). Le milieu réactionnel est alors lavé avec une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (200 mL), puis avec de l'eau distillée (2 x 200 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le carbonate **4** est ensuite précipité avec de l'éther diéthylique (300 mL) pour donner une poudre blanc cassé séchée une nuit sous vide (25,4 g, 76,5%).

## ANALYSES

**Point de fusion** : 104°C.

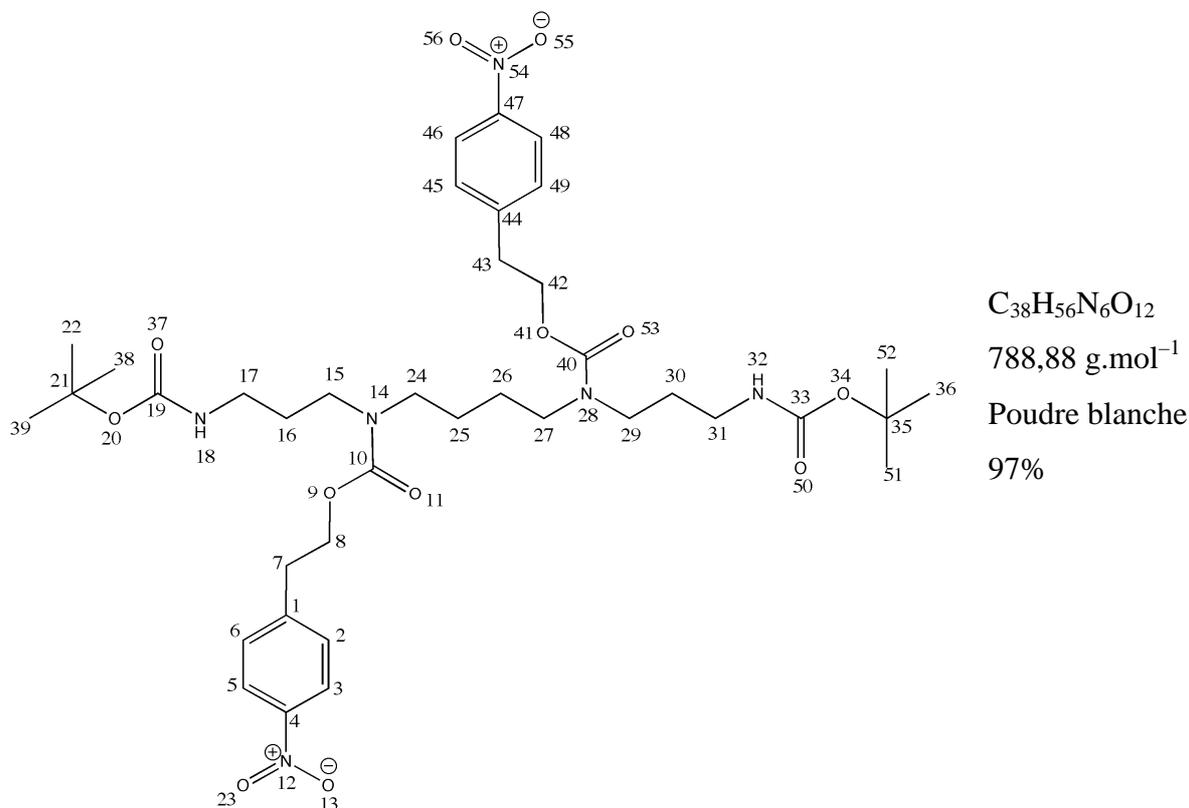
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** : δ 8,25-8,15 (m, 4H, **H-3**, **H-5**, **H-17**, **H-19**), 7,44-7,29 (m, 4H, **H-2**, **H-6**, **H-16**, **H-20**), 4,54-4,51 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H, **H-13**), 3,19-3,13 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, **H-14**).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)** : δ 155,45 (1C, **C-1**), 152,38 (1C, **C-8**), 147,17 (1C, **C-4**), 145,51 (1C, **C-18**), 144,79 (1C, **C-15**), 129,97 (2C, **C-16**, **C-20**), 125,38 (2C, **C-3**, **C-5**), 123,95 (2C, **C-17**, **C-19**), 121,84 (2C, **C-2**, **C-6**), 68,63 (1C, **C-13**), 34,80 (1C, **C-14**).

**RMN <sup>13</sup>C DEPT (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)** : δ 129,97 (CH, 2C, **C-16**, **C-20**), 125,38 (CH, 2C, **C-3**, **C-5**), 123,95 (CH, 2C, **C-17**, **C-19**), 121,84 (CH, 2C, **C-2**, **C-6**), 68,63 (CH<sub>2</sub>, 1C, **C-13**), 34,80 (CH<sub>2</sub>, 1C, **C-14**).

**IR** : ν = 3085 (Ar-H, faible), ν = 1766 (C=O, fine et forte), ν = 1519 (NO<sub>2</sub> as, très fine et forte), ν = 1347 (NO<sub>2</sub> sym, très fine et forte) cm<sup>-1</sup>.

**Analyse élémentaire** : calculée pour C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> : C : 54,22%, H : 3,64%, N : 8,43% ; trouvée : C : 54,18%, H : 3,6%, N : 8,5%.

E. Synthèse de la  $N^1, N^4$ -bis-Boc- $N^2, N^3$ -bis-Npeoc-spermine (**5**)

## MODE OPERATOIRE

À une solution de spermine bi-protégée **3** (15,5 g, 39 mmol, 1 éq.) dans du DCM (115 mL) sont ajoutés, sous agitation et à température ambiante, le carbonate **4** (26,9 g, 81 mmol, 2,1 éq.) et du DMAP (4,9 g, 40 mmol, 1 éq.). Le milieu réactionnel est ainsi laissé une nuit à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout d'une solution aqueuse de  $Na_2CO_3$  1 M (200 mL). Un précipité se forme (sels). Le mélange est dilué avec de l'eau distillée (100 mL) puis les phases sont séparées. La phase organique est lavée à nouveau avec une solution de  $Na_2CO_3$  1 M (2 x 200 mL) puis séchée sur  $MgSO_4$  anhydre. Après filtration, la solution est évaporée sous pression réduite. Le produit est ensuite cristallisé avec de l'éther diéthylique (300 mL) puis filtré, lavé à l'éther froid et séché une nuit sous vide. Le produit **5** obtenu est une poudre blanche ( $m = 29,4 \text{ g}$ , 97%).

**ANALYSES**

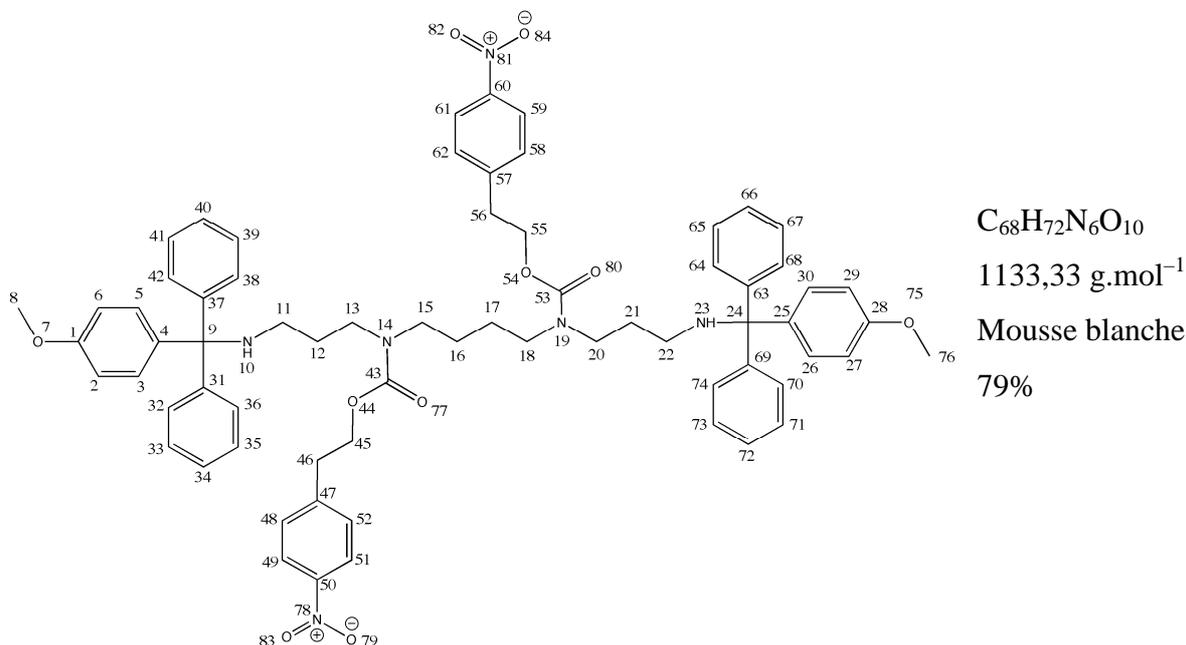
**Point de fusion :** 134°C.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) :** δ 8,11-8,09 (d, *J* = 8,4 Hz, 4H, **H-3, H-5, H-46, H-48**), 7,34-7,32 (m, 4H, **H-2, H-6, H-45, H-49**), 5,11 (br, 1H), 4,60 (br, 1H, **H-18, H-32**), 4,30-4,27 (t, *J* = 6,6 Hz, 4H, **H-8, H-42**), 3,19-2,93 (m, 16H, **H-15, H-29, H-17, H-31, H-7, H-43, H-24, H-27**), 1,58-1,53 (m, 4H, **H-16, H-30**), 1,37 (s, 18H, **H-22, H-36, H-38, H-39, H-51, H-52**), 1, 30-1,21 (br m, 4H, **H-25, H-26**).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) :** δ 156,39-155,85 (4C, **C-10, C-40, C-19, C-33**), 146,93 (2C, **C-1, C-44**), 146,15 (2C, **C-4, C-47**), 129,85 (4C, **C-2, C-6, C-45, C-49**), 123,76 (4C, **C-3, C-5, C-46, C-48**), 79,47-79,07 (2C, **C-21, C-35**), 64,92 (2C, **C-8, C-42**), 47,11, 46,53 (pic démultiplié, 2C, **C-15, C-29**), 44,52 (2C, **C-24, C-27**) 38,13, 37,43 (pic démultiplié, 2C, **C-17, C-31**), 35,49 (2C, **C-7, C-43**), 29,22 (2C, **C-16, C-30**), 28,51 (6C, **C-22, C-36, C-38, C-39, C-51, C-52**), 25,86-25,22 (2C, **C-25, C-26**).

**IR :** ν = 3350 (N-H, faible et large), ν = 1694 (C=O, forte), ν = 1519 (NO<sub>2</sub> as, fine et forte), ν = 1346 (NO<sub>2</sub> sym, très fine et forte) cm<sup>-1</sup>.

**Analyse élémentaire :** calculée pour C<sub>38</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> : C : 57,85%, H : 7,15%, N : 10,65% ; trouvée: C : 57,68%, H : 7,35%, N : 10,60%.

F. Synthèse de la  $N^1, N^4$ -bis-MMT- $N^2, N^3$ -bis-Npeoc-spermine (**6**)**MODE OPERATOIRE**

À une solution de spermine tétraprotégée **5** (29,4 g, 37 mmol, 1 éq.) dissoute dans du DCM (180 mL), refroidie à 0°C est ajouté goutte-à-goutte et sous agitation de l'acide trifluoroacétique (44,4 g, 390 mmol, 10,5 éq.). Après addition, la réaction est laissée 2h à température ambiante sous agitation. Puis le milieu réactionnel est évaporé. Le produit brut ainsi obtenu contient de l'acide trifluoroacétique. Le produit déprotégé est ensuite mis sous agitation dans du DCM (100 mL) et refroidi à 0°C. Un large excès de triéthylamine (72,6 g, 720 mmol) dans du DCM (50 mL) est ajouté goutte-à-goutte pour éviter un échauffement trop violent du milieu réactionnel. Cet excès de triéthylamine est utilisé pour neutraliser l'acide trifluoroacétique, pour déprotéger les amines primaires et pour capter l'HCl généré par la réaction de tritylation. Un dégagement de fumée apparaît. Le bain de glace est ensuite enlevé et le chlorure de 4-monométhoxytrityle (48,2 g, 156 mmol, 4,2 éq.) dissous dans du DCM (100 mL) est ajouté d'un coup à température ambiante. Le milieu réactionnel devient rouge puis brun et un dégagement de fumées blanches est observé. Après 30 min de réaction à température ambiante, une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (150 mL) est ajoutée. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du DCM (2 x 150 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous pression réduite.

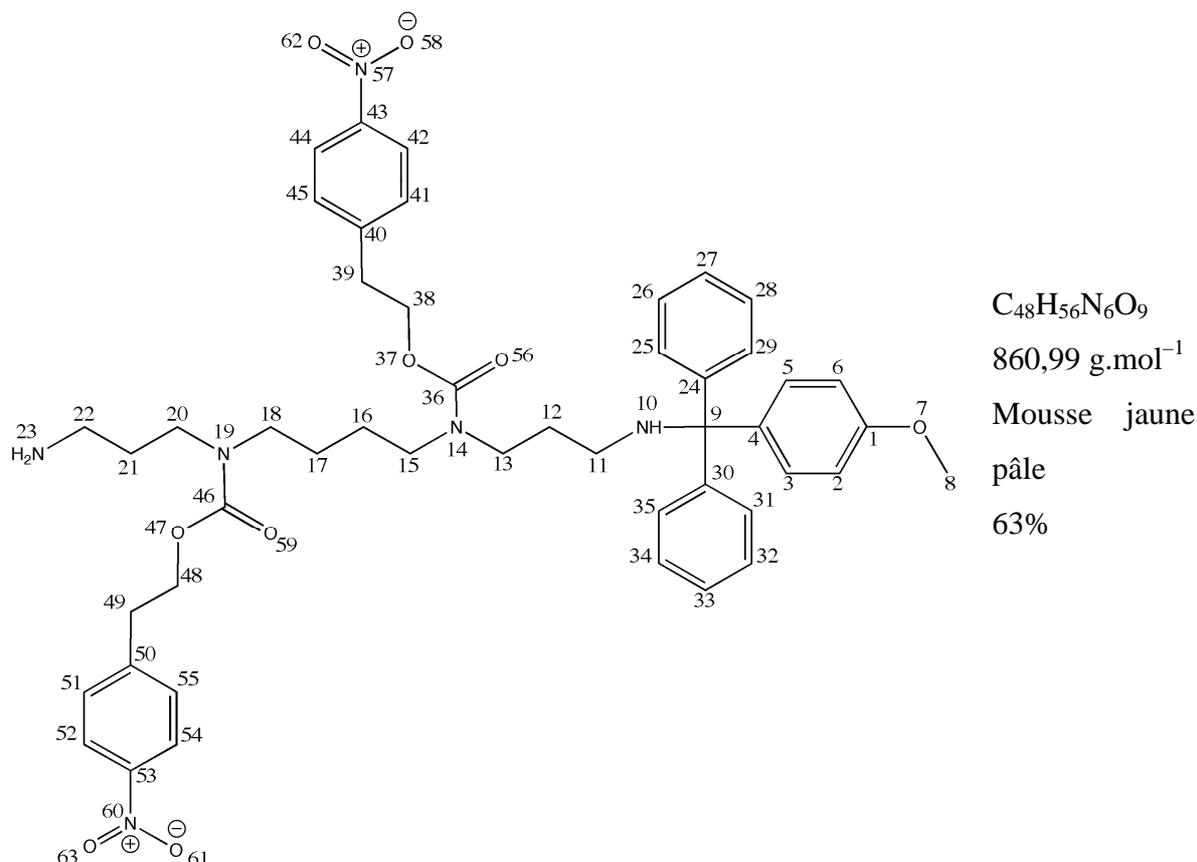
Le produit brut (m = 60 g) est purifié par chromatographie flash sur gel de silice 40-63  $\mu\text{m}$  (éluant : AcOEt : CyH 1:1). La mousse blanche ainsi obtenue (33,5 g, 79%) est séchée une nuit sous vide.

## ANALYSES

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  8,15-8,04 (m, 4H, **H-49, H-51, H-59, 61**), 7,43-7,41 (d,  $J = 7,6$  Hz, 8H, **H-33, H-35, H-39, H-41, H-65, H-67, H-71, H-73**), 7,33-7,32 (d,  $J = 8,4$  Hz, 4H, **H-48, H-52, H-58, H-62**), 7,28-7,23 (m, 12H, **H-3, H-5, H-26, H-30, H-32, H-36, H-38, H-42, H-64, H-68, H-70, H-74**), 7,18-7,13 (m, 4H, **H-34, H-40, H-66, H-72**), 6,79-6,75 (m, 4H, **H-2, H-6, H-27, H-29**), 4,25-4,22 (br m, 4H, **H-45, H-55**), 3,74 (s, 6H, **H-8, H-76**), 3,27-2,94 (br m, 12H, **H-13, H-15, H-18, H-20, H-46, H-56**), 2,05 (br m, 4H, **H-11, H-22**), 1,66-1,30 (br m, 8H, **H-12, H-16, H-17, H-21**).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  158,04-157,94 (pic démultiplié, 2C, **C-1, C-28**), 155,90 (2C, **C-43, C-53**), 146,92 (4C, **C-31, C-37, C-63, C-69**), 146,57, 146,41, 146,22 (4C, **C-47, C-50, C-57, C-60**), 138,48-138,29 (pic démultiplié, 2C, **C-4, C-25**), 129,85 (4C, **C-48, C-52, C-58, C-62**), 128,63 (12C, **C-3, C-5, C-26, C-30, C-32, C-36, C-38, C-42, C-64, C-68, C-70, C-74**), 127,97 (8C, **C-33, C-35, C-39, C-41, C-65, C-67, C-71, C-73**), 126,45-126,26 (pic démultiplié, 4C, **C-34, C-40, C-66, C-72**), 123,79 (4C, **C-49, C-51, C-59, C-61**), 113,27 (4C, **C-2, C-6, C-27, C-29**), 70,30 (2C, **C-9, C-24**), 64,78 (2C, **C-45, C-55**), 55,33 (2C, **C-8, C-76**), 47,24-46,46 (pic démultiplié, 2C, **C-15, C-18**), 45,51 (2C, **C-13, C-20**), 41,36-40,87 (pic démultiplié, 2C, **C-11, C-22**), 35,54 (2C, **C-46, C-56**), 30,08-29,26 (pic démultiplié, 2C, **C-12, C-21**), 25,92-25,51 (pic démultiplié, 2C, **C-16, C-17**).

**IR :**  $\nu = 1690$  (C=O, forte),  $\nu = 1518$  ( $\text{NO}_2$  as, fine et forte),  $\nu = 1344$  ( $\text{NO}_2$  sym, très fine et forte)  $\text{cm}^{-1}$ .

G. Synthèse de la  $N^1$ -MMT- $N^2, N^3$ -bis-Npeoc-spermine (**7**)

## MODE OPERATOIRE

À de la spermine tétraprotégée **6** (33,5 g , 30 mmol, 1 éq.) dissoute dans du DCM (33,5 g) est ajouté d'un seul coup à température ambiante de l'acide trifluoroacétique (6,8 g, 59 mmol, 2 éq.) dans du DCM (200 mL). Le milieu réactionnel prend alors une couleur orange qui s'intensifie au cours de la réaction. La réaction est suivie par CCM et stoppée lorsque la tache orange correspondant au composé mono-tritylé est à peu près aussi intense que celle du composé bi-tritylé (éluant : DCM : MeOH : NH<sub>3</sub>, 90 : 10 : 1, révélateur : solution de PMA à 5% dans l'éthanol). Au bout d'1 h, la réaction est stoppée par l'ajout d'une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (400 mL). Cette phase aqueuse est extraite par du DCM (2 x 200mL). Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> anhydre pendant 15 min puis filtrées et évaporées. Le produit brut obtenu, est purifié par chromatographie flash (silice 40-63 µm, gradient : DCM : MeOH 90 : 10 jusqu'à DCM : MeOH : NH<sub>3</sub> (2 M dans du MeOH) 80 : 20 : 6). Le produit pur **7** obtenu (m = 6,8 g, 8%) est une mousse jaune pâle.

La réaction a par la suite été réitérée 2 fois selon ce protocole sur les fractions contenant le produit **6** n'ayant pas réagi. La deuxième réaction est effectuée pendant 35 min sur le produit **6** (23,3 g, 21 mmol, 1 éq.), en présence de TFA (5,3 g, 2,3 éq.) avec un rendement en produit **7** s'élevant à 33% (5,9 g). La troisième réaction est réalisée en 55 min sur le produit **6** (11,5g, 10 mmol, 1 éq.), en présence de TFA (2,5 g, 2,1 éq.) avec un rendement en produit **7** s'élevant à 38% (3,3 g). Le rendement global en spermine mono-déprotégée **7** atteint alors 63% (16 g) par rapport à la quantité initiale de spermine **6** engagée (30 mmol).

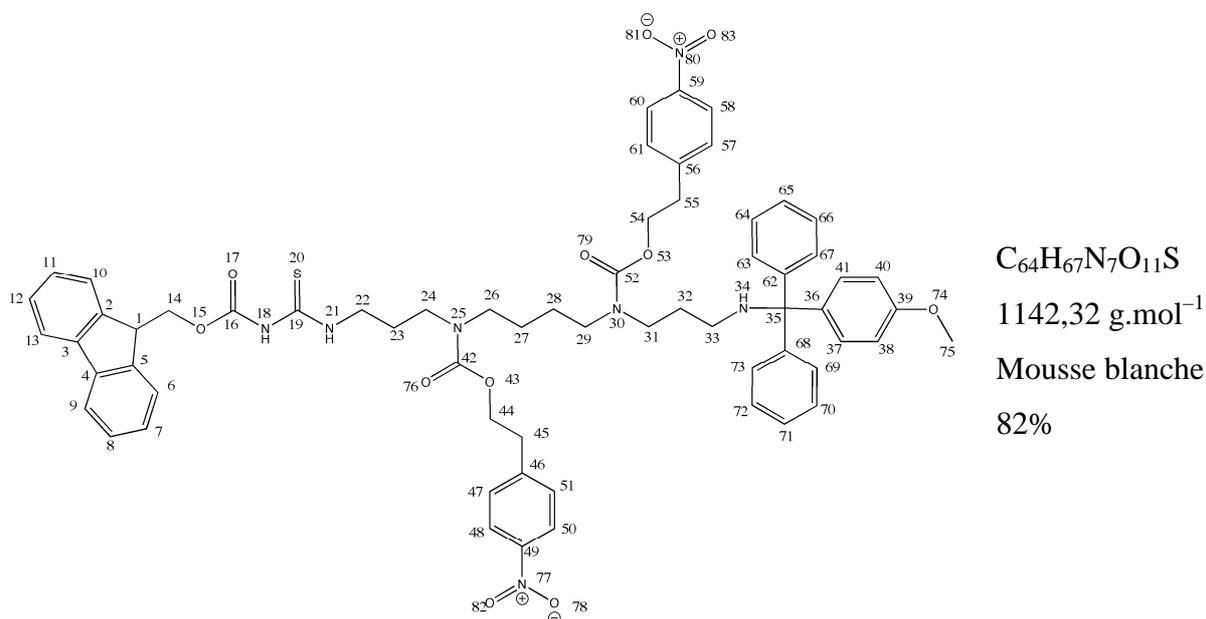
## ANALYSES

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) :** δ 8,14-8,04 (dd,  $J_1 = 29,2$  Hz,  $J_2 = 8$  Hz, 4H, **H-42**, **H-44**, **H-52**, **H-54**), 7,43-7,41 (d,  $J = 8$  Hz, 4H, **H-26**, **H-28**, **H-32**, **H-34**), 7,35-7,23 (m, 10H, **H-3**, **H-5**, **H-25**, **H-29**, **H-31**, **H-35**, **H-41**, **H-45**, **H-51**, **H-55**), 7,17-7,14 (m, 2H, **H-34**, **H-40**), 6,79-6,76 (m, 2H, **H-2**, **H-6**), 4,32-4,24 (dt,  $J_1 = 18,8$  Hz,  $J_2 = 6,4$  Hz, 4H, **H-38**, **H-48**), 3,75 (s, 3H, **H-8**), 3,27-2,96 (m, 12H, **H-13**, **H-15**, **H-18**, **H-20**, **H-39**, **H-49**), 2,69-2,59 (m, 2H, **H-22**), 2,06 (br m, 2H, **H-11**), 1,98 (br m, 3H, **H-10**, **H-23**), 1,66-1,24, (br m, 8H, **H-12**, **H-16**, **H-17**, **H-21**).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) :** δ 157,96-157,85 (pic démultiplié, 1C, **C-1**), 155,85 (2C, **C-36**, **C-46**), 146,87-146,82 (2C, **C-24**, **C-30**), 146,49, 146,32, 146,18 (4C, **C-40**, **C-43**, **C-50**, **C-53**), 138,40-138,19 (pic démultiplié, 1C, **C-4**), 129,83 (4C, **C-41**, **C-45**, **C-51**, **C-55**), 128,54 (6C, **C-3**, **C-5**, **C-25**, **C-29**, **C-31**, **C-35**), 127,88 (4C, **C-26**, **C-28**, **C-32**, **C-34**), 126,35-126,18 (pic démultiplié, 2C, **C-27**, **C-33**), 123,70 (4C, **C-42**, **C-44**, **C-52**, **C-54**), 113,18 (2C, **C-2**, **C-6**), 70,45 (1C, **C-9**), 64,95-64,75 (2C, **C-38**, **C-48**), 55,24 (1C, **C-8**), 47,17-47,08, 46,53-46,37, 45,44 (pic démultiplié, 6C, **C-13**, **C-15**, **C-18**, **C-20**, **C-39**, **C-49**), 41,27-40,78 (1C, **C-11**), 35,46 (2C, **C-22**), 31,98 (1C, **C-21**), 30,45-29,16 (pic démultiplié, 1C, **C-12**), 25,83-25,38 (pic démultiplié, 2C, **C-16**, **C-17**).

**MS (ESI) :**  $m/z$  calculée : 860,4, trouvée : 861,4  $[M+H]^+$ .

## H. Synthèse de la $N^1$ -(Fmoc-thiourée)- $N^2,N^3$ -bis-Npeoc- $N^4$ -MMT-spermine (**8**)



### MODE OPERATOIRE

À du Fmoc-isothiocyanate (6,4 g, 23 mmol, 1,5 éq.) dissous dans du DCM (300 mL) est ajoutée à 0°C, sous agitation et sous argon, l'amine **7** (12,7 g, 15 mmol, 1 éq.) dissoute dans du DCM (50 mL). La réaction se fait instantanément (suivi CCM, éluant AcOEt : CyH 1 : 1, révélateur solution de PMA à 5% massique dans l'éthanol). Le bain de glace est alors retiré et le milieu réactionnel est évaporé. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash (silice 40-63 µm, éluant : AcOEt : CyH 1 : 1). Les fractions contenant le produit sont collectées, évaporées et séchées une nuit sous vide. Une mousse blanche est ainsi obtenue (m = 13,9 g, 82%).

### ANALYSES

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) :** δ 9,89 (br s, 1H, **H-18**), 9,59 (br s, 1H, **H-21**), 8,10-8,04 (m, 4H, **H-48**, **H-50**, **H-58**, **H-60**), 7,77-7,75 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-9**, **H-13**), 7,54-7,52 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-6**, **H-10**), 7,42-7,38 (m, 6H, **H-8**, **H-12**, **H-63**, **H-67**, **H-69**, **H-73**), 7,33-7,28 (m, 8H, **H-7**, **H-11**, **H-37**, **H-41**, **H-47**, **H-51**, **H-57**, **H-61**), 7,26-7,23 (m, 4H,

**H-64, H-66, H-70, H-72)**, 7,17-7,14 (br m, 2H, **H-65, H-71**), 6,79-6,76 (br m, 2H, **H-38, H-40**), 4,47-4,46 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H, **H-14**), 4,34-4,20 (m, 5H, **H-1, H-44, H-54**), 3,74 (s, 3H, **H-75**), 3,64-3,52 (br m, 2H, **H-22**), 3,26-2,95 (br m, 12H, **H-24, H-26, H-29, H-31, H-45, H-55**), 2,07-2,04 (br m, 2H, **H-33**), 1,82-1,33 (br m, 8H, **H-23, H-27, H-28, H-32**).

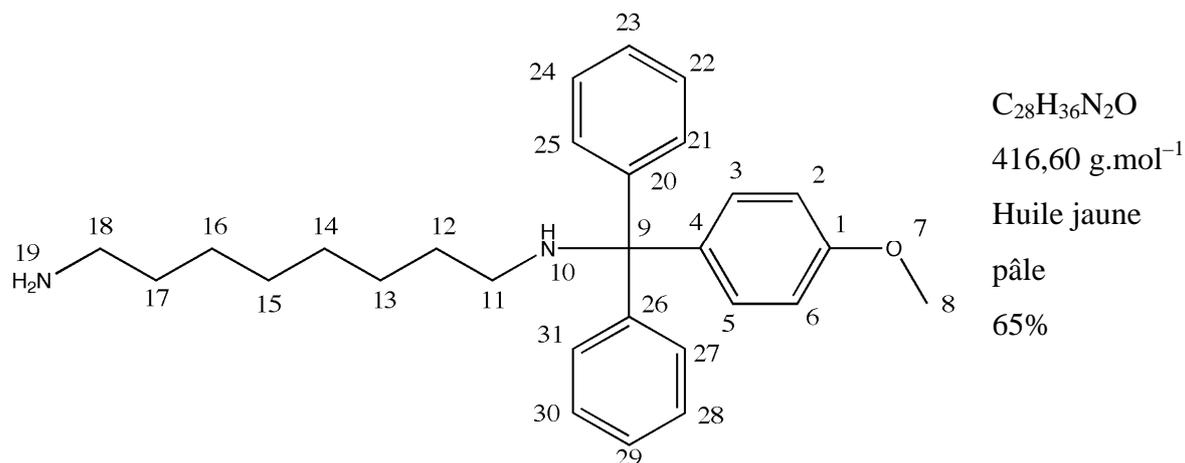
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  179,24 (1C, **C-19**), 158,01-157,91 (pic démultiplié, 1C, **C-39**), 155,89 (2C, **C-42, C-52**), 156,59, 152,81-152,46, 148,96 (pic démultiplié, 1C, **C-16**), 146,93-146,89 (pic démultiplié, 2C, **C-62, C-68**), 146,55, 146,37, 146,20, 146,03, (4C, **C-46, C-49, C-56, C-59**), 143,03 (2C, **C-2, C-5**), 141,43 (2C, **C-3, C-4**), 138,46 (1C, **C-36**), 129,83 (4C, **C-47, C-51, C-57, C-61**), 128,60 (6C, **C-37, C-41, C-63, C-67, C-69, C-73**), 128,23 (2C, **C-8, C-12**), 127,94-127,86 (pic démultiplié, 4C, **C-64, C-66, C-70, C-72**), 127,39 (2C, **C-7, C-11**), 126,42-126,22 (pic démultiplié, 2C, **C-65, C-71**), 125,01 (1C, **C-6, C-10**), 123,79-123,77 (pic démultiplié, 4C, **C-48, C-50, C-58, C-60**), 120,35 (2C, **C-9, C-13**), 113,24 (2C, **C-38, C-40**), 70,51 (1C, **C-35**), 68,49-68,37 (pic démultiplié, 1C, **C-14**), 65,03-64,77 (pic démultiplié, 2C, **C-44, C-54**), 55,31 (1C, **C-75**), 46,42, 46,81, 47,14, 46,42 (pic démultiplié, 2C, **C-26, C-29**), 46,63 (1C, **C-1**), 45,51 (1C, **C-31**), 44,65 (1C, **C-24**), 42,81-43,02 (1C, **C-22**), 41,33-40,85 (1C, **C-33**), 35,50 (2C, **C-45, C-55**), 30,07, 29,22, 27,48-27,05, 25,87-25,44 (pic démultiplié, 4C, **C-23, C-27, C-28, C-32**).

**RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  129,83 (CH, 4C, **C-47, C-51, C-57, C-61**), 128,60 (CH, 6C, **C-37, C-41, C-63, C-67, C-69, C-73**), 128,23 (CH, 2C, **C-8, C-12**), 127,94-127,86 (pic démultiplié, CH, 4C, **C-64, C-66, C-70, C-72**), 127,39 (CH, 2C, **C-7, C-11**), 126,42-126,22 (pic démultiplié, CH, 2C, **C-65, C-71**), 125,01 (CH, 1C, **C-6, C-10**), 123,79-123,77 (pic démultiplié, CH, 4C, **C-48, C-50, C-58, C-60**), 120,35 (CH, 2C, **C-9, C-13**), 113,24 (CH, 2C, **C-38, C-40**), 68,49-68,37 (pic démultiplié,  $\text{CH}_2$ , 1C, **C-14**), 65,03-64,77 (pic démultiplié,  $\text{CH}_2$ , 2C, **C-44, C-54**), 55,31 ( $\text{CH}_3$ , 1C, **C-75**), 46,42, 46,81, 47,14, 46,42 (pic démultiplié,  $\text{CH}_2$ , 2C, **C-26, C-29**), 46,63 (CH, 1C, **C-1**), 45,51 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-31**), 44,65 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-24**), 42,81-43,02 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-22**), 41,33-40,85 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-33**), 35,50 ( $\text{CH}_2$ , 2C, **C-45, C-55**), 30,07, 29,22, 27,48-27,05, 25,87-25,44 ( $\text{CH}_2$ , pic démultiplié, 4C, **C-23, C-27, C-28, C-32**).

**HRMS (ESI) :** calculée pour  $\text{C}_{64}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}$  : 1141,46, trouvée : 1142,47  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**IR :**  $\nu = 3294$  (NH, faible),  $\nu = 1693$  (C=O, forte),  $\nu = 1518$  (NO<sub>2</sub> as, fine et forte),  $\nu = 1345$  (NO<sub>2</sub> sym, très fine et forte) cm<sup>-1</sup>

### I. Synthèse de la N<sup>8</sup>-MMT-octane-1,8-diamine (**9**)



### MODE OPERATOIRE

À du diaminooctane (7,2 g, 50 mmol, 5 éq.) dissous dans du DCM (70 mL) est ajouté goutte-à-goutte pendant 2h à 0°C et sous agitation du chlorure de 4-monométhoxytrityle (3,3 g, 10 mmol, 1 éq.) dissous dans du DCM (200 mL). Puis la réaction est laissée à équilibrer à température ambiante pendant 1 h 15. Une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (200 mL) est alors ajoutée, les phases sont séparées, et la phase aqueuse est extraite par du DCM (2 x 100 mL). Après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, la phase organique est filtrée et est évaporée sous pression réduite. Le produit brut obtenu (m = 6,8 g) est purifié par chromatographie flash (silice 40-63 μm, éluant : DCM : MeOH : Et<sub>3</sub>N 90 : 10 : 2). Le produit pur obtenu est une huile jaune pâle (m = 2,7 g, 65%).

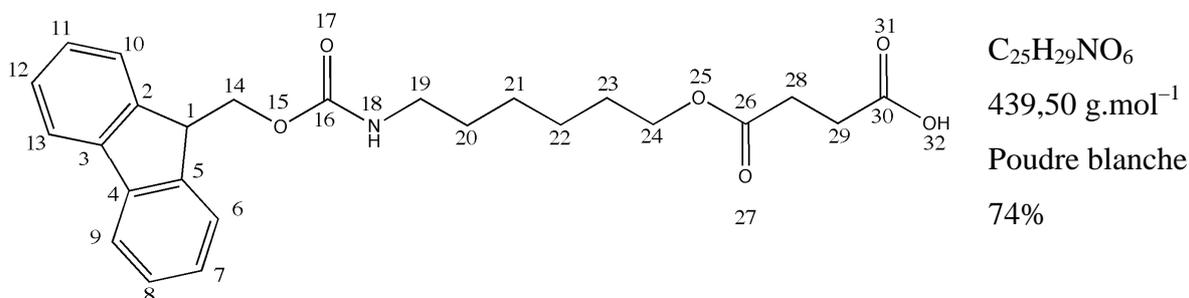
### ANALYSES

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) :**  $\delta$  7,46-7,43 (m, 4H, **H-22**, **H-24**, **H-28**, **H-30**), 7,37-7,33 (m, 2H, **H-3**, **H-5**), 7,26-7,22 (m, 4H, **H-21**, **H-25**, **H-27**, **H-31**), 7,17-7,12 (m, 2H, **H-23**, **H-29**), 6,80-6,76 (m, 2H, **H-2**, **H-6**), 3,75 (s, 3H, **H-8**), 2,69-2,66 (t,  $J = 7,1$  Hz, **H-11**), 2,11-2,07 (t,

$J = 7$  Hz, 2H, **H-18**), 1,48-1,40 (m, 4H, **H-12**, **H-17**), 1,30-1,21 (m, 8H, **H-13**, **H-14**, **H-15**, **H-16**).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :  $\delta$  157,93 (1C, **C-1**), 146,81 (2C, **C-20**, **C-26**), 138,75 (1C, **C-4**), 129,97 (2C, **C-3**, **C-5**), 128,75 (4C, **C-21**, **C-25**, **C-27**, **C-31**), 127,86 (4C, **C-22**, **C-24**, **C-28**, **C-30**), 126,22 (2C, **C-23**, **C-29**), 113,19 (2C, **C-2**, **C-6**), 70,53 (1C, **C-9**), 55,34 (1C, **C-8**), 43,75 (1C, **C-11**), 42,03 (1C, **C-18**), 33,04 (1C, **C-12**), 31,06 (1C, **C-17**), 29,76 (1C, **C-13**), 29,55 (1C, **C-16**), 27,50 (1C, **C-15**), 26,98 (1C, **C-14**).

### J. Synthèse du succinate de *N*-Fmoc-amino-6-hexanyl (**10**)



### MODE OPERATOIRE

Du 6-(Fmoc-amino)-1-hexanol (10 g, 30 mmol, 1 éq.) et de l'anhydride succinique (4,5 g, 45 mmol, 1,5 éq.) sont suspendus à 0°C dans de la pyridine (20 mL). Du DCM (20 mL) est ensuite ajoutés pour aider à la solubilisation, sans résultat. La réaction est laissée à réagir une nuit à température ambiante. Le lendemain, tout est dissous. Du DCM (200 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est lavé par une solution phosphate de sodium à pH = 5 (2 x 200 mL) puis par une solution aqueuse de NaCl saturée (2 x 200 mL). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis évaporée sur rotavap et laissée une nuit sous vide. Le lendemain, un solide blanc cassé a pris en masse. Après reprecipitation et trituration dans un mélange éther diéthylique : n-heptane 1 : 4, une poudre blanche est obtenue et séchée une nuit sous vide (m = 9,6 g, 74%).

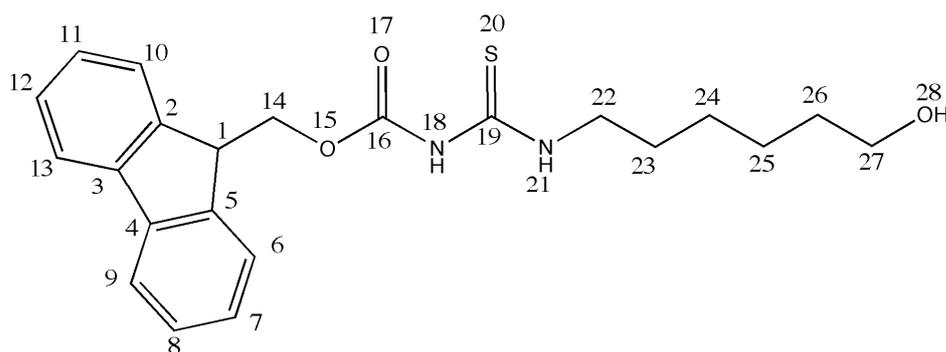
## ANALYSES

Point de fusion : 82°C.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :  $\delta$  10,04 (br s, 1H, **H-32**), 7,75-7,73 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-9**, **H-12**), 7,58-7,56 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H, **H-6**, **H-13**), 7,39-7,36 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-8**, **H-11**), 7,31-7,27 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-7**, **H-10**), 6,32, 4,92 (br s, 1H, **H-18**), 4,45-4,38 (m, 2H, **H-14**), 4,22-4,17 (m, 1H, **H-1**), 4,1-4,07 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2H, **H-24**), 3,19-3,07 (br m, 4H, **H-28**, **H-29**), 1,64-1,57 (quintuplet,  $J = 6,4$  Hz, 2H, **H-23**), 1,51-1,45 (quintuplet,  $J = 6,4$  Hz, 2H, **H-20**), 1,43-1,26 (br m, 4H, **H-21**, **H-22**).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :  $\delta$  177,01 (1C, **C-30**), 172,42 (1C, **C-26**), 156,80 (1C, **C-16**), 144,12 (2C, **C-2**, **C-5**), 141,47 (2C, **C-3**, **C-4**), 127,82 (2C, **C-8**, **C-12**), 127,18 (2C, **C-7**, **C-11**), 125,17 (2C, **C-6**, **C-10**), 120,11 (2C, **C-9**, **C-13**), 66,75 (1C, **C-14**), 64,83 (1C, **C-24**), 47,43 (1C, **C-1**), 41,00 (1C, **C-19**), 29,87 (1C, **C-20**), 29,27 (1C, **C-29**), 29,16 (1C, **C-28**), 28,60 (1C, **C-23**), 26,72 (1C, **C-21**), 25,61 (1C, **C-22**).

IR :  $\nu = 3332$  (NH, faible),  $\nu = 3068$  (Ar-H, faible),  $\nu = 1713$  (C=O, très forte)  $\text{cm}^{-1}$ .

K. Synthèse du (Fmoc-thiourée)-hexan-1-ol (**11**)

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

398,52  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Mousse rose  
pâle

70%

## MODE OPERATOIRE

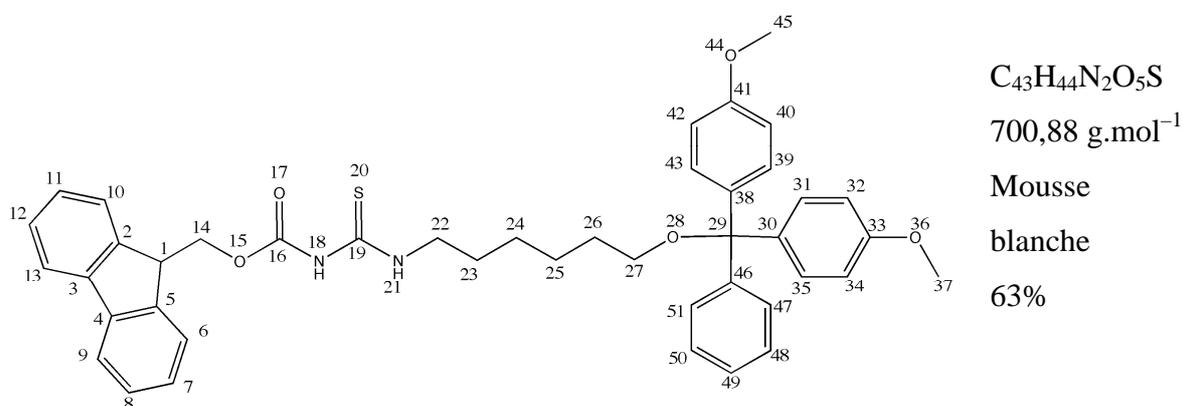
À du 6-amino-1-hexanol (2,5 g, 21 mmol, 1,05 éq.) dissous dans du DCM (100 mL), refroidi par un bain de glace est ajouté goutte-à-goutte pendant 15 min du *N*-Fmoc-isothiocyanate

(5,7 g, 20 mmol, 1 éq.) en solution dans du DCM (100 mL). La réaction est ensuite laissée 15 min à équilibrer à température ambiante avant ajout d'une solution aqueuse de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M (200 mL). Le milieu réactionnel est lavé à nouveau par une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (200 mL). Puis la phase organique est séchée par  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée. Le produit est ensuite purifié par chromatographie flash (silice 40-63  $\mu\text{m}$ , éluant : DCM : MeOH 95 : 5). Le produit obtenu est une mousse rose pâle (5,7 g, 70%).

## ANALYSES

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  9,62 (br s, 1H, **H-18**), 8,31 (br s, 1H, **H-21**), 7,77-7,75 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-9**, **H-13**), 7,55-7,53 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-6**, **H-10**), 7,42-7,39 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-8**, **H-12**), 7,33-7,29 (t dédoublé,  $J_1 = 1,2$  Hz,  $J_2 = 7,6$  Hz, 2H, **H-7**, **H-11**), 4,67-4,45 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H, **H-14**), (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H, **H-1**), 3,66-3,60 (m, 4H, **H-22**, **H-27**), 1,69-1,62 (quintuplet,  $J = 7,2$  Hz, 2H, **H-26**), 1,59-1,52 (m, 2H, **H-23**), 1,43-1,37 (m, 2H, **H-24**, **H-25**).

## L. Synthèse du (Fmoc-thiourée)-O-DMT-oxyhexane (**12**)



## MODE OPERATOIRE

À l'alcool **11** (5,7 g, 14 mmol, 1 éq.) dans de la pyridine (50 mL), refroidi à  $0^\circ\text{C}$ , est ajouté d'un seul coup à température ambiante du chlorure de 4,4'-diméthoxytryptyle (5,2 g, 15 mmol, 1,1 éq.). La réaction est instantanée. La pyridine est évaporée sur évaporateur rotatif puis sous

vide poussé. Le produit est purifié par chromatographie flash (silice 40-63  $\mu\text{m}$ , éluant : dichlorométhane). Le produit obtenu est une mousse blanche (6,2 g, 63%).

## ANALYSES

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :**  $\delta$  9,59 (br s, 1H, **H-18**), 8,01 (br s, 1H, **H-21**), 7,76-7,74 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-9**, **H-13**), 7,55-7,53 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, **H-6**, **H-10**), 7,44-7,38 (m, 4H, **H-8**, **H-12**, **H-39**, **H-43**), 7,33-7,22 (m, 8H, **H-7**, **H-11**, **H-31**, **H-35**, **H-47**, **H-48**, **H-50**, **H-51**), 7,19-7,16 (m, 1H, **H-49**), 6,83-6,79 (m, 4H, **H-32**, **H-34**, **H-40**, **H-42**), 4,45-4,44 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H, **H-14**), 4,22-4,19 (t,  $J = 6,8$  Hz, 1H, **H-1**), 3,76 (s, 6H, **H-37**, **H-45**), 3,65-3,60 (m, 2H, **H-22**), 3,07-3,03 (t,  $J = 6,4$  Hz, **H-27**), 1,68-1,57 (m, 4H, **H-23**, **H-26**), 1,45-1,30 (m, 4H, **H-24**, **H-25**).

**RMN  $^{13}\text{C}$  J-mod ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :** 179,04 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 1C, **C-19**), 158,55 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 2C, **C-33**, **C-41**), 152,79 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 1C, **C-16**), 145,61 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 2C, **C-30**, **C-38**), 143,13 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 2C, **C-2**, **C-5**), 141,51 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 2C, **C-3**, **C-4**), 136,94 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 2C, **C-30**, **C-38**), 130,19 (CH, 4C, **C-31**, **C-35**, **C-39**, **C-43**), 128,41 (CH, 2C, **C-47**, **C-51**), 128,24 (CH, 2C, **C-8**, **C-12**), 127,83 (CH, 2C, **C-48**, **C-50**), 127,43 (CH, 2C, **C-7**, **C-11**), 126,72 (CH, 1C, **C-49**), 125,05 (CH, 2C, **C-6**, **C-10**), 120,34 (CH, 2C, **C-9**, **C-13**), 113,20 (CH, 4C, **C-32**, **C-34**, **C-40**, **C-42**), 85,91 ( $\text{C}^{\text{IV}}$ , 1C, **C-29**), 68,38 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-14**), 63,41 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-27**), 55,36 ( $\text{CH}_3$ , 1C, **C-37**), 46,78 (CH, 1C, **C-1**), 45,89 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-22**), 30,11 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-26**), 28,39 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-23**), 26,97 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-25**), 26,16 ( $\text{CH}_2$ , 1C, **C-24**).

**IR :**  $\nu = 3295$  (NH, faible),  $\nu = 3034$  (Ar-H, faible),  $\nu = 1718$  (C=O, fine et forte)  $\text{cm}^{-1}$ .

## M. Test de déprotection des groupements Npeoc en solution

À une solution de spermine protégée **6** à 20 mM dans l'acétonitrile (250  $\mu\text{L}$ ) est ajoutée une solution de DBU 2 M dans l'acétonitrile (250  $\mu\text{L}$ ). La solution résultante spermine **6** 10 mM / DBU 1 M est homogénéisée (Vortex) puis centrifugée. Aux intervalles de temps suivants : t+0 (20 s), t+10 min, t+20 min, t+40 min, t+80 min, t+160 min, 50  $\mu\text{L}$  de solution sont prélevés, placés dans une fiole jaugée (5 mL) et complétés au trait de jauge par de l'acétonitrile. Après agitation, 100  $\mu\text{L}$  sont à nouveau prélevés et complétés à 1 mL par de

l'acétonitrile pour être ensuite dosé en UV à 303 nm. Des échantillons de référence : une solution de DBU 1 M et la spermine **6** à 10 mM dans l'acétonitrile ( $t = 0$ ) sont également réalisés.

## N. Test de déprotection des groupements Fmoc en solution

À une solution de spermine **8** à 20 mM dans l'acétonitrile (250  $\mu$ L) est ajoutée une solution de DBU 6% dans l'acétonitrile (250  $\mu$ L). La solution résultante spermine **8** 10 mM / DBU 3% est homogénéisée (Vortex) puis centrifugée. Aux intervalles de temps suivants :  $t = 0$ ,  $t+0$  (20 s),  $t+5$  min,  $t+10$  min, 50  $\mu$ L de solution sont prélevés, placés dans une fiole jaugée (5 mL) et complétés au trait de jauge par de l'acétonitrile. Après agitation, 100  $\mu$ L sont à nouveau prélevés et complétés à 1 mL par de l'acétonitrile pour être ensuite dosé en UV à 294 nm et 304 nm.

## III. SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE

### A. Synthèse d'oligonucléotides couplés en 5' à des guanidino-spermines

#### 1. Synthèse d'oligonucléotides amino-modifiés

##### a. Synthèse de l'oligonucléotide

Les décânières ADN ont été fabriqués de façon automatisée sur un synthétiseur d'oligonucléotides Expedite Nucleic Acid Synthesis System (GMI Inc.) grâce au logiciel Expedite Workstation. La séquence programmée : 5'-GCGATGCCAC-3' a été synthétisée avec des réactifs phosphoramidites ADN standards : dA-CE-phosphoramidite, dC-CE-phosphoramidite (protections benzoyles des bases), dG-CE-phosphoramidite (protection isobutyryle), dT-CE-phosphoramidite. Chaque phosphoramidite (0,5 g) est dissout sous argon dans de l'acétonitrile anhydre (10 mL) et placée respectivement aux positions A, C, G, T du synthétiseur. Le support utilisé est une résine 3'-dC-CPG (colonne 1  $\mu$ mol),

l'activateur est indifféremment du 5-benzylthio-1H-tétrazole ou du tétrazole 0,45M dans l'acétonitrile (Glen research), les réactifs de cap sont THF : Ac<sub>2</sub>O 9 : 1 (Cap Mix A) et THF : MeIm : Pyridine 8 : 1 : 1 (cap Mix B), la solution oxydante est une solution d'I<sub>2</sub> dans un mélange THF : Pyridine : H<sub>2</sub>O. Le protocole employé respecte les étapes usuelles de synthèse d'oligonucléotides classique, c'est-à-dire : détritulation, couplage, oxydation, capping. Le support 3'-dC-CPG subit toutefois un premier capping pour s'assurer qu'il n'y ait pas de groupements hydroxyles déprotégés. Les temps et volumes de réactifs requis pour chaque étape du cycle correspondent au protocole classique de synthèse d'ADN préconisé par le fabricant GMI Inc. Les synthèses sont toutes réalisées en conservant le DMT final. Ceci permet la purification ultérieure d'oligonucléotides témoins sur cartouche PolyPak II ou l'évaluation du rendement de couplage du 5'-amino-modifier C6.

#### **b. Évaluation du rendement : protocole de dosage du DMT**

À chaque cycle de détritulation, les fractions contenant le cation DMT<sup>+</sup> sont collectées pour dosage à 503 nm. La fraction prélevée est transférée dans une fiole jaugée de 5 mL et complétée au trait de jauge avec du DCM ayant servi au rinçage du tube de collection de fraction (au moins 3 rinçages). Après agitation, 250 µL de cette fiole sont prélevés et déposés dans une deuxième fiole jaugée de 5 mL et complétés au trait de jauge par une solution de TCA dans du DCM 5% massique. La solution est alors agitée et 1 mL est placé dans une cuve en quartz pour mesure de l'absorbance à 503 nm. Ce dosage permet l'estimation de différents rendements :

Rendement par étape :  $R_{\text{étape}} = A_{503}(n) / A_{503}(n-1)$  où n = nombre de cycles de détritulation

Rendement global :  $R = A_{503}(n) / A_{503}(1)$

Rendement moyen par couplage :  $R_{\text{moy}} = R^{1/(n-1)}$

Pour les synthèses de nos décimères, les rendements de couplages moyens sont compris entre 95,0% et 99,5%.

#### **c. Protocole de couplage du 5'-amino-modifier C6**

Le phosphoramidite 5'-amino-modifier C6 (0,25 g) est dissout sous argon dans 4 mL d'acétonitrile anhydre (C = 100 mM) puis transféré en conditions anhydres dans un flacon adaptable sur synthétiseur Expedite. Ce flacon a préalablement été séché en étuve à 70°C et laissé à refroidir dans un dessiccateur sous argon. La solution de 5'-amino-modifier est séchée une nuit sur du tamis activé (3 Å) en position 5 du synthétiseur. Le couplage de

l' amino-modifier sur le décamère est réalisé à l'aide du cycle X du protocole standard de synthèse d'ADN, c'est-à-dire en augmentant le temps nécessaire au couplage à 15 min. Le MMT final est conservé pour purification ultérieure (colonne témoin) ou évaluation du rendement.

#### **d. Évaluation du rendement : protocole de dosage du MMT**

À la fin du couplage de l' amino-modifier, le groupement MMT est déprotégé comme suit : sur synthétiseur, la solution de deblock (solution de TCA 3% dans l'acétonitrile) est passée pendant 15 s au travers de la colonne puis laissée à agir 3 min. La solution de TCA est alors à nouveau passée 15 s au travers de la colonne. Ce cycle est répété 4 fois au total pour un temps de détritylation de 13 min. La solution contenant le cation MMT<sup>+</sup> est collectée dans une fiole jaugée (100 mL) et la colonne est rincée avec 2 volumes d'acétonitrile puis séchée sous argon. La solution de MMT est alors complétée au trait de jauge par une solution de TCA 5% massique dans du DCM. Un millilitre de cette solution est prélevé et transféré dans une cuve en quartz pour dosage à 478 nm. Le rendement de couplage de l' amino-modifier peut alors être estimé comme suit :

$$R = \frac{A_{478} \times \text{Corr.UV}}{A_{503}}$$

où  $A_{478}$  est l'absorbance du MMT,  $A_{503}$  est l'absorbance du dernier DMT et Corr. UV est un facteur de correction entre l'absorbance du MMT à 478 nm et l'absorbance du DMT à 503 nm, à concentrations équivalentes. Ce facteur de correction est de 1,36. Les rendements de couplage de l' amino-modifier obtenus dans ces conditions sont compris entre 82,3% et 99,9%.

## **2. Couplage des guanidinospermines en 5'**

### **a. Couplage de la spermine 8**

Le synthon **8** (34,3 mg, 30  $\mu$ mol, 30  $\text{éq.}$ ) et l'activateur EDCI (12,6 mg, 66  $\mu$ mol, 66  $\text{éq.}$ ) sont séchés 30 min. sous vide puis dissous par vortexation dans une solution de DIPEA 0,2M dans le DCM (330  $\mu$ L, 66  $\mu$ mol, 66  $\text{éq.}$ ) séchée une nuit sur tamis moléculaire (3 Å). Après centrifugation, la solution est prélevée et percolée sans interruption au travers de la colonne

(~ 1  $\mu\text{mol}$ , 1  $\text{éq.}$ ) pendant 2 min à l'aide de deux seringues embranchées aux deux extrémités de la colonne. La réaction est ensuite laissée 4h à procéder en percolant de temps à autre. Au bout de 4h, les réactifs sont soutirés et la colonne est rincée par 5 x 1 mL de DCM puis séchée sous argon. Si un couplage supplémentaire doit être effectué, le support est détritylé selon le protocole décrit précédemment, sinon, l'oligonucléotide conserve le MMT final pour la purification par cartouche PolyPak II (Glen Research). Les rendements de couplage pour ce protocole sont compris entre 55% et 84%.

Différents paramètres ont été testés avant d'établir ce protocole et ont permis de retenir les conditions expérimentales optimales. Sauf indication contraire, chaque paramètre a été testé en respectant les quantités et volumes du protocole précédent en modifiant seulement le solvant, l'activateur, la base, le temps de réaction ou le mode d'introduction des réactifs.

#### **b. Déprotection des Fmoc et Npeoc**

Une solution de DBU 1M dans de l'acétonitrile (1 mL, 1 mmol) est percolée de temps à autre au travers de la colonne pendant 4h. La colonne est ensuite rincée par 5 x 1 mL d'acétonitrile puis 3 x 1 mL de DCM avant d'être séchée sous argon.

#### **c. Décrochage du support et déprotection de l'oligonucléotide**

La colonne est coupée au cutter et la résine est transvasée dans un tube eppendorf à vis. De l'ammoniac concentré aqueux (28%) est versé sur l'échantillon et la réaction est laissée à température ambiante pendant 24h.

#### **d. Purification des conjugués oligonucléotides-guanidinospermines**

Les oligonucléotides sont purifiés par cartouche PolyPak II en adaptant le protocole du fabricant à la déprotection du groupement MMT. Les oligonucléotides témoins possédant un DMT final sont purifiés selon le protocole du fabricant.

1. La cartouche est rincée par de l'acétonitrile (4 mL) et une solution de TEAA 2M (4 mL).
2. L'oligonucléotide est dilué en ajoutant 3 portions d'eau mQ pour 1 portion de solution ammoniaquée.

3. L'oligonucléotide est passé au travers de la cartouche. L'éluat est collecté et repassé à travers la colonne de façon à s'assurer que les groupements trityles sont bien retenus sur la cartouche.
4. Les séquences tronquées sont éluées par de l'ammoniac dilué au 1/20<sup>e</sup> (6 mL).
5. La colonne est rincée à l'eau mQ (4 mL)
6. Une solution de TFA 2% dans l'eau mQ (4 mL) est laissée agir 2 min sur la colonne avant d'être poussée hors du système. Ce cycle est répété 3 fois en tout. Bien que l'exposition d'un oligonucléotide à une solution acide ne soit pas souhaitable en raison de risques de dépurination, ces cycles sont nécessaires à une déprotection correcte des groupements MMT.
7. La cartouche est rincée avec de l'eau mQ pour éliminer le TFA résiduel.
8. L'oligonucléotide est élué soit par une solution d'acétonitrile 20% dans l'eau, soit par une solution ammoniacuée diluée au 1/10<sup>e</sup>.

Les oligonucléotides sont ensuite lyophilisés, dissous dans de l'eau mQ, puis dosés en UV à 260 nm selon un protocole décrit [255], enfin stockés à -20°C. À ce stade, certains oligonucléotides ont également été purifiés par HPLC sur colonne DNA Pac 100 analytique (4 mm x 250 mm) avec un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> en utilisant comme éluant une solution de NaCl 1M avec pour gradient : 30% jusqu'à 100% en 20 min (NH<sub>3</sub> 0,1M + 10% d'acétonitrile constant). Après purification par HPLC, les fractions contenant l'oligonucléotide ont été regroupées et dessalées à l'aide de cartouche Sephadex NAP-25, selon le protocole recommandé par le fabricant (<http://www.gelifesciences.com>). L'oligonucléotide est ensuite dosé en UV à 260 nm [255] et stocké à -20°C.

## B. Synthèse d'oligonucléotides conjugués en 3' (support dT-CPG amino-modifié)

### 1. Couplage de spermines sur dT-CPG amino-modifiée (1 µmol)

#### a. Modification d'une colonne dT (1 µmol)

Une colonne dT-CPG est détritylée de façon automatisée sur le synthétiseur par une solution de TCA 3% dans l'acétonitrile. La fraction DMT est collectée et dosée en UV à 503 nm selon le protocole décrit précédemment (p.182) La colonne est ensuite rincée manuellement par du

DCM (3 x 1 mL) et séchée sous argon. Une solution de CDI (32 mg, 200  $\mu$ mol) dans du DCM distillé et séché sur tamis moléculaire (1 mL) est percolée à travers la colonne pendant 1h. Le réactif est ensuite soutiré du système, la colonne est rincée par du DCM (2 x 1 mL) et séchée sous argon. La diamine protégée **9** (50 mg, 120  $\mu$ mol) et de la triéthylamine (12,3 mg, 120  $\mu$ mol) dans du DCM anhydre (1 mL) sont percolés pendant 2h. Les réactifs sont ensuite soutirés, le support est rincé par du DCM (3 x 1 mL) et séché sous argon. Les rendements évalués après étapes de cap et de détritulation sont compris entre 75% et 80%.

N.B. : Dans un premier temps, ce protocole a été suivi avec des diamines non protégées : le diaminopropane (9 mg, 120  $\mu$ mol) ou le 1, 8-diaminooctane (17,5 mg, 120  $\mu$ mol).

**b. Capping du support après couplage de la N<sup>δ</sup>-MMT-octane-1,8-diamine (9)**

Les sites actifs qui n'ont pas réagi sont cappés automatiquement sur le synthétiseur d'oligonucléotide en utilisant les solutions d'anhydride acétique (Cap Mix A) et de *N*-méthylimidazole (Cap Mix B). L'étape de cap s'effectue selon le protocole standard avec un temps de réaction accru à 6 min. Deux autres réactifs de cap ont également été testés manuellement : une solution de chlorure de Fmoc (26,0 mg, 100  $\mu$ mol, 100 éq.) et de la *N*-méthylimidazole (8,2 mg, 100  $\mu$ mol, 100 éq.) dans du DCM (1 mL) ou une solution de carbonate **4** (33,3 mg, 100  $\mu$ mol, 100 éq.) et de la DMAP (12,6 mg, 100  $\mu$ mol) dans du DCM (1 mL) ont été percolées sur la résine pendant 2 h.

**c. Détritulation du MMT après couplage de la N<sup>δ</sup>-MMT-octane-1,8-diamine (9)**

La déprotection du MMT et l'évaluation du rendement de couplage s'effectuent selon le protocole établi précédemment (p.183).

**d. Couplage de la spermine 8**

Une solution de DIPEA 0,4M dans du DCM (1 mL) est passée à travers la colonne dT-CPG aminomodifiée. La thiourée **8** (22,8 mg, 20  $\mu$ mol, 20 éq.) et EDCI (17 mg, 88  $\mu$ mol, 88 éq.), séchés 30 min sous vide, sont mélangés et dissous dans une solution de DIPEA 0,4M (220  $\mu$ L, 88  $\mu$ mol, 88 éq.) avant d'être percolés à travers la colonne pendant 4h. Les réactifs sont alors soutirés et la colonne rincée avec du DCM (3 x 1 mL) puis séchée sous argon. Les rendements de couplage évalués après étapes de cap et de détritulation sont compris entre 70% et 88%.

**e. Capping et détritylation du support après couplage de la spermine 8**

Après couplage de la spermine **8**, le capping et la détritylation du support s'effectuent de la même façon qu'après l'étape d'introduction de la fonction amine sur la colonne dT-CPG (p.186).

**2. Couplage de spermines sur dT-CPG amino-modifiée (20  $\mu\text{mol}$ )****a. Modification du support dT**

De la résine dT-CPG (500 mg, charge  $42 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , 20  $\mu\text{mol}$ ) est placée dans une colonne Pierce centrifuge de 5 mL. L'extrémité protectrice inférieure de la colonne est enlevée pour permettre le soutirage des réactifs. La résine est alors détritylée par passage de 20 mL d'une solution de TCA 5% dans le DCM puis rincée par 10 mL d'acétonitrile et 10 mL de DCM. Après détritylation, l'ouverture supérieure de la colonne est fermée par un bouchon percé de quelques trous, placée dans un ballon de 250 mL et la résine peut ainsi être séchée une nuit sous vide. Le vide est fait progressivement afin d'éviter que de la résine ne soit aspirée hors de la colonne. Le DCM servant aux réactions est distillé la veille et séché une nuit sur tamis moléculaire activé 3 Å. La triéthylamine est également distillée la veille et conservée une nuit sur KOH. L'amine **9** est dissoute dans 2 mL de DCM et séchée une nuit sur tamis moléculaire activé 3 Å. La colonne contenant la résine séchée est bouchée à l'extrémité inférieure puis recouverte d'un septum pour la partie supérieure après avoir fait passer un flux d'argon sur la résine. Du CDI (345 mg, 2 mmol, 100 éq.) est dissous dans 2 mL de DCM distillé prélevé sous argon. La dissolution n'étant pas totale, seul le surnageant est prélevé et déposé sous argon sur la résine. Afin de s'assurer que toute la résine est imbibée de solution, la seringue servant au prélèvement est enfoncée jusqu'au fond de la colonne avant de déposer la solution. La colonne est inclinée légèrement de chaque côté et tapotée doucement pour permettre à la solution de s'infiltrer au cœur de la résine. La réaction est alors laissée 1 h à température ambiante sur plaque d'agitation (vitesse 4). Au bout d'1 h, la solution de CDI est soutirée et la résine est lavée avec 10 mL de DCM distillé.

**b. Couplage de l'amine 9**

L'amine **9** en solution dans le DCM (553 mg, 1,33 mmol, 65 éq.) et de la triéthylamine distillée (168 mg, 1,66 mmol, 80 éq.) sont déposées sous argon et réparties sur la résine selon

le même mode opératoire que pour le CDI. La réaction est alors laissée 22 h 30 à température ambiante sur plaque d'agitation (vitesse 4). La dT-CPG est ensuite lavée par 25 mL de DCM, le solvant résiduel est chassé sous flux d'argon puis la résine est séchée 30 min sous vide.

### c. Évaluation du rendement de couplage de l'amine 9

Cinq milligrammes de résine sont prélevés, placés dans une colonne 1  $\mu\text{mol}$  et détritylés sur synthétiseur selon le protocole usuel de détritulation du MMT. Ce protocole est légèrement adapté : la solution de MMT est collectée dans une fiole jaugée de 25 mL. Seul un volume d'acétonitrile est passé pour rincer la colonne à la fin de la détritulation. La charge de la résine est alors calculée selon la formule donnée ci dessous [256].

$$\text{Charge } (\mu\text{mol.g}^{-1}) = \frac{A_{478} \times \text{volume (mL)} \times 1000}{56 \text{ (mL.cm}^{-1}\text{.mol}^{-1}) \times m_{\text{résine}} \text{ (mg)}}$$

Le rendement obtenu est alors calculé simplement en faisant le rapport entre la charge initiale de la résine et la charge après couplage. Pour cette expérience, la charge de la résine après couplage est de 41  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ , soit un rendement de 98%.

### d. Capping de la résine après couplage de l'amine 9

Les sites n'ayant pas réagi sont cappés sous argon et sous agitation (vitesse 4) pendant 30 min par un mélange de solutions de Cap Mix A :  $\text{Ac}_2\text{O}$  : THF 9 : 1 (1 mL) et de Cap Mix B : THF : *N*-MeIm : Pyridine (1 mL). La résine est ensuite rincée par de l'acétonitrile anhydre (10 mL) et du DCM (10 mL) puis séchée sous un flux d'argon.

### e. Couplage du synthon spermine 8

Une solution de TCA 5% dans le DCM est passée sur la résine (40 mL) jusqu'à décoloration totale de la résine. La résine est considérée comme détritylée s'il n'y a pas réapparition d'une couleur jaune-orangée caractéristique du cation MMT après 15 min en contact avec quelques mL de solution de TCA. La résine est alors rincée par du DCM (20 mL), de l'acétonitrile (20 mL) puis à nouveau du DCM (20 mL). Après détritulation la résine est séchée une nuit sous vide. Le DCM servant aux réactions est distillé et séché sur tamis moléculaire activé 3 Å. Une solution de DIPEA distillée 1,1 M dans du DCM distillé est conservée sur KOH. Le synthon 8 et l'EDCI sont séchés respectivement une nuit et une heure sous vide avant

réaction. Une solution de DIPEA 1,1 M (2 mL) est passée sur la résine sous argon avant dépôt des réactifs. La thiourée **8** (183 mg, 160  $\mu$ mol, 8  $\text{eq.}$ ) dissoute dans du DCM (1 mL) et l'EDCI (170 mg, 880  $\mu$ mol, 44  $\text{eq.}$ ) dissous dans une solution de DIPEA 1,1 M (800  $\mu$ L, 880  $\mu$ mol, 44  $\text{eq.}$ ) sont mélangés et répartis sur la résine à l'aide d'une seringue. La réaction est alors laissée à procéder à température ambiante pendant 24 h sous agitation (vitesse 4) et sous argon. Les réactifs sont alors soutirés et la résine est rincée par du DCM (20 mL) puis par de l'acétonitrile (20 mL) puis à nouveau par du DCM (5 mL) avant d'être séchée sous vide. L'évaluation du rendement se fait de la même façon que pour le couplage de l'amine **9**.

#### **f. Capping de la résine après couplage du synthon **8****

Les sites n'ayant pas réagi sont cappés de la même façon qu'après couplage de l'amine **9** (p.186), en modifiant seulement le volume de Cap Mix A et Cap Mix B (1,5 mL pour chaque solution).

Les couplages supplémentaires sont effectués avec les mêmes quantités de réactifs, en suivant les mêmes étapes : détritylation, couplage, évaluation du rendement, capping. Lorsque l'évaluation du rendement est insatisfaisante, l'étape de couplage peut être répétée avant capping.

### **3. Synthèse d'oligonucléotides sur support dT-CPG**

#### **a. Synthèse de l'oligonucléotide**

La synthèse de décamères 5'-GCGATGCCAC-3' sur les supports a été réalisée de façon automatisée sur un synthétiseur d'oligonucléotides, en utilisant des réactifs phosphoramidites ADN standards. Les réactifs de cap, d'activation ou d'oxydation sont les mêmes que décrits précédemment (p.181). Le support dC-CPG a été remplacé par les supports dT-CPG sur lesquels a (ont) été couplée(s) la (les) spermine(s). Dans le cas de la synthèse de supports spermines à l'échelle de 20  $\mu$ mol, quelques mg de résine correspondant environ à 0,5-1  $\mu$ mol sont placés dans une colonne vide adaptée au synthétiseur d'oligonucléotides. La synthèse est effectuée en respectant le protocole standard de synthèse d'ADN. Le premier nucléotide est couplé au support par un lien phosphoramidate. Pour cela, le temps du premier couplage est augmenté à 15 min: le cycle X est donc modifié de façon à prélever le premier nucléotide en

position C du synthétiseur. Le rendement moyen par couplage pour ces synthèses est compris entre 96,1% et 99,3%

#### **b. Déprotection des Fmoc, Npeoc et cyanoéthyles**

Les groupements Fmoc, Npeoc et cyanoéthyles sont déprotégés par percolation au travers de la colonne d'une solution de DBU 1M dans l'acétonitrile (1 mL) pendant 4 h à 8 h. La colonne est ensuite rincée par 5 x 1 mL d'acétonitrile puis séchée sous flux d'argon.

Alternativement, cette étape de déprotection des groupements Npeoc peut être réalisée après décrochage de l'oligonucléotide du support et déprotection des bases. En ce cas, l'oligonucléotide est lyophilisé après traitement par NH<sub>4</sub>OH 28%, puis suspendu dans une solution de DBU 1M (300 µL) et placé sur plaque d'agitation (vitesse d'agitation 7) pendant 18 h. Après lyophilisation, l'oligonucléotide est alors purifié par cartouche PolyPak selon le protocole classique.

#### **c. Évaluation du décrochage d'oligonucléotides par traitement par DBU 1M**

La solution de DBU 1M (1 mL) est récupérée et déposée dans une fiole jaugée de 5 mL et complétée au trait de jauge par du DCM. Après agitation, 250 µL de cette solution sont également déposés dans une fiole jaugée (5 mL) et complétés au trait de jauge par une solution de TCA 5%. On mesure alors l'absorbance de cette solution à 503 nm. Afin d'évaluer le pourcentage de perte de l'oligonucléotide, il suffit de faire le ratio entre l'absorbance correspondant à la quantité d'oligonucléotide perdue et l'absorbance totale des DMT:

$$\% \text{ de perte} = \frac{A_{503 \text{ nm}} (\text{ON décroché}) \times 100}{A_{503 \text{ nm}} (\text{DMT final} + \text{ON décroché})}$$

#### **d. Décrochage du support et déprotection des bases**

Le protocole suivi est identique à celui indiqué p.184.

#### **e. Purification des oligonucléotides**

Les oligonucléotides sont soit purifiés sur PolyPak II en respectant le protocole standard, soit purifiés par HPLC semi-préparative. Le pic purifié est alors le pic majoritaire possédant encore son groupement DMT final.

La purification par HPLC est effectuée sur HPLC Gilson, en utilisant une colonne DNA Pac PA100 semi-prep (9 x 250 mm). Le débit est fixé à 4 mL.min<sup>-1</sup>. L'élution est réalisée avec un gradient d'une solution de KBr ,5 M 10% à 25% en 5 min puis 25% à 35% en 10 min (NaOH constant). La collection de fraction se fait de façon automatisée. Les fractions contenant le produit sont rassemblées, neutralisées par de l'acide acétique puis lyophilisées et dessalées.

#### **f. Dessalage après purification par HPLC**

L'oligonucléotide purifié en HPLC est dessalé sur cartouche Glen Pak DNA en modifiant le protocole standard de la façon suivante :

1. La fraction contenant l'oligonucléotide est dissoute dans 2 mL d'eau mQ
2. De l'acétonitrile (1 mL) puis une solution de TEAA pH = 7 (1 mL) sont passés au travers de la cartouche
3. L'oligonucléotide est chargé sur la colonne
4. De l'eau mQ (10 mL) est passée pour enlever les sels
5. Une solution aqueuse de TFA 2% (2 mL) est passée pour déprotéiner l'oligonucléotide
6. Le TFA résiduel est rincé par de l'eau mQ (2 mL)
7. L'oligonucléotide est élué par une solution d'acétonitrile : eau mQ 50 : 50 supplémentée par de l'ammoniac aqueux 28% à raison de 100 µL pour 10 mL de solution (2-3 mL)
8. Les fractions contenant l'oligonucléotide sont rassemblées et lyophilisées.

L'oligonucléotide est ensuite dissous dans de l'eau mQ, dosé en UV à 260 nm et conservé à -20°C.

### **C. Synthèse d'oligonucléotides conjugués en 3' (support sarcosyl-succinyl-CPG)**

#### **1. Synthèse du support sarcosyl-succinyl-CPG**

##### **a. Couplage de la Fmoc-sarcosine sur la lcaa-CPG**

La lcaa-CPG (5,55 g, 136 µmol.g<sup>-1</sup>) est laissée 24 h à activer dans une solution de TCA 5% dans le DCM (75 mL). Le lendemain, la résine est filtrée et lavée par du DCM (75 mL) et de

MeOH : Pyridine : Acétonitrile 1 : 1 : 1 (75 mL) puis séchée sous vide. La Fmoc-sarcosine (2,04 g, 7,2 mmol, 10 éq.) mélangée à la lcaa-CPG activée (5,55 g, 0,72 mmol, 1 éq.) est séchée 1 h sous vide puis transvasée dans un flacon. De la pyridine (1,6 mL, 19,8 mmol, 27 éq.), du DIC (2,8 mL, 18,1 mmol, 25 éq.) et du DMF anhydre (12,5 mL) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'une spatule, puis le flacon est fermé et placé sur plaque d'agitation (vitesse 4) pendant 40 h à température ambiante. La solution est alors rouge foncé, on note la présence de cristaux en forme d'aiguilles. La résine est filtrée et rincée par du DMF (75 mL), par un mélange de MeOH : Pyridine : Acétonitrile 1 : 1 : 1 (75 mL) puis par de l'acétonitrile (20 mL). Malgré ces lavages, la résine garde une couleur rose saumon. La résine est ensuite séchée sous vide.

### b. Évaluation du rendement de couplage de la sarcosine

Quelques mg de CPG sont prélevés et déposés dans une fiole jaugée de 5 mL. Une solution de pipéridine 20% dans le DMF est déposée sur la résine jusqu'au trait de jauge et la réaction est laissée 30 min à température ambiante. Après 30 min, 1 mL de cette solution est prélevé pour dosage à 300 nm. Pour calculer la charge de la résine après couplage, il suffit de calculer le nombre de moles de 9-méthylfluorène libérées par rapport à la quantité de support engagée ( $\epsilon_{300 \text{ nm}} = 7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ ).

$$\text{Charge } (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{A_{300} \times \text{Volume (L)}}{m_{\text{résine}} (\text{mg}) \times \epsilon_{300}}$$

La première évaluation de la charge de la résine est de  $110 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , soit un rendement de 80%. Afin d'avoir un support optimal, un deuxième couplage est effectué selon le même protocole pour augmenter le rendement de couplage. La charge de la résine atteint alors  $127 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , soit un rendement de 97,5%.

### c. Déprotection des groupements Fmoc

La résine est placée dans un flacon et mise sous agitation 45 min dans une solution de pipéridine 10% dans de la pyridine (20 mL). La résine est ensuite filtrée et rincée par un mélange de MeOH : Pyridine : Acétonitrile 1 : 1 : 1 (75 mL) puis par de l'acétonitrile (20 mL).

**d. Couplage du succinate 10**

Le succinate **10** (3,1 g, 7 mmol, 10 éq.), de la pyridine (1,6 mL, 19,8 mmol, 28 éq.) et du DIC (2,8 mL, 18,1 mmol, 25 éq.) dissous dans du DMF (12,5 mL) sont mélangés à la sarcosyl-CPG (5,5 g,  $127 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , 0,7 mmol, 1 éq.). La réaction est laissée 40h à température ambiante sur plaque d'agitation (vitesse 2). La résine est ensuite filtrée et rincée par du DMF (75 mL), par un mélange de MeOH : Pyridine : Acétonitrile 1 : 1 : 1 (75 mL) puis par de l'acétonitrile (20 mL) et séchée sous vide. L'évaluation du rendement est effectuée de la même façon qu'après couplage de la sarcosine (p.192). Le rendement estimé par cette méthode s'élève à 95%, soit une charge de la sarcosyl-succinyl-CPG s'élevant à  $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ .

**2. Couplage de la spermine 8****a. Déprotection des fonctions amines**

Le support sarcosyl-succinyl-CPG (300 mg,  $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , 36  $\mu\text{mol}$ ) est placé dans une colonne Pierce centrifuge 5 mL et mis sous agitation 1h dans une solution de pipéridine 10% dans le DMF (3 mL). La résine est ensuite filtrée et rincée par un mélange de MeOH : Pyridine : Acétonitrile 1 : 1 : 1 (20 mL) puis par du DCM (10 mL) et séchée sous vide.

**b. Couplage de la spermine 8**

L'activateur EDCI (272 mg, 1,41 mmol, 40 éq.) et la thiourée **8** (330 mg, 290  $\mu\text{mol}$ , 8 éq.) mélangée à la CPG (300 mg,  $120 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , 36  $\mu\text{mol}$ , 1 éq.) sont séchés 45 min sous vide avant couplage. L'EDCI et de la DIPEA (246  $\mu\text{L}$ , 1,41 mmol, 40 éq.) sont alors dissous dans du DCM distillé (2,5 mL) avant d'être déposée sur le mélange résine/thiourée **8**. Le milieu réactionnel est homogénéisé, puis la réaction est laissée 24 h à procéder à température ambiante, sous argon et sous agitation (vitesse 3). Le rendement est évalué en prélevant et détritulant quelques mg de résine.

$$\text{Charge } (\mu\text{mol.g}^{-1}) = \frac{A_{478} \times \text{volume (mL)} \times 1000}{56 (\text{mL.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}) \times m_{\text{résine}} (\text{mg})}$$

Ce support ayant une charge particulièrement plus importante que les supports précédents, tous les couplages de thiourée **8**, ont été effectués deux fois avant les étapes de cap et de détritulation. Les couplages successifs sont effectués en adaptant le protocole décrit aux quantités engagées, en respectant bien entendu le nombre d'équivalents de chacun des réactifs.

**c. Capping de la résine après couplage de la spermine **8****

Les sites n'ayant pas réagi sont cappés sous argon et sous agitation (vitesse 4) pendant 2h par un mélange de solutions de Cap Mix A : Ac<sub>2</sub>O : THF 9 : 1 (1 mL) et de Cap Mix B : THF : *N*-MeIm : Pyridine (1 mL). La résine est ensuite rincée par de l'acétonitrile anhydre (20 mL) et du DCM (20 mL), séchée par un flux d'argon.

**d. Détritulation de la résine**

Une solution de TCA 5% dans le DCM est passée sur la résine jusqu'à décoloration totale de la résine. La résine est considérée comme détritillée s'il n'y a pas réapparition d'une couleur jaune-orangée caractéristique du cation MMT après 15 min en contact avec quelques mL de solution de TCA. La résine est alors rincée par du DCM (20 mL), de l'acétonitrile (20 mL) puis à nouveau du DCM (20 mL) et séchée sous vide.

**e. Couplage de la molécule thiourée **13****

Le couplage est effectué de la même façon que pour le couplage de la thiourée **8**, en respectant le même nombre d'équivalents (p.193). En moyenne, le rendement de couplage de la molécule **13** sur les supports 1S, 2S, 3S est de 90%.

### 3. Synthèse de l'oligonucléotide

La synthèse de décamères 5'-GCGATGCCAC-3' sur les supports a été réalisée de façon automatisée sur un synthétiseur d'oligonucléotides, en utilisant des réactifs phosphoramidites standards. Les réactifs de cap, d'activation ou d'oxydation sont les mêmes que décrits précédemment (p.181). Le support dC-CPG a été remplacé par les supports sarcosyl-succinyl sur lesquels ont été couplées la (les) spermine(s) et la molécule **13** qui permet l'introduction d'une fonction terminale alcool protégée. La synthèse s'effectue en doublant, par rapport au

protocole standard, les quantités d'activateur et de phosphoramidites injectées ainsi que les temps de couplage.

**a. Déprotection des Fmoc, Npeoc et cyanoéthyles**

Les groupements Fmoc, Npeoc et cyanoéthyles sont déprotégés par percolation au travers de la colonne d'une solution de DBU 1 M dans l'acétonitrile (1 mL) pendant une nuit jusqu'à 4-5 jours. La déprotection s'effectue à température ambiante dans le noir.

**b. Évaluation du décrochage d'oligonucléotides par traitement par DBU 1M**

La solution de DBU 1 M (1 mL) est récupérée et déposée dans une fiole jaugée de 5 mL et complétée au trait de jauge par une solution de TCA 5%. Après agitation, 250 µL de cette solution sont également déposés dans une fiole jaugée (5 mL) et complétés au trait de jauge par une solution de TCA 5%. On mesure alors l'absorbance de cette solution à 503 nm.

$$Q^{\text{té}} \text{ perdue } (\mu\text{mol.g}^{-1}) = \frac{A_{478} \times \text{volume (mL)} \times 1000}{76 (\text{mL.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}) \times m_{\text{résine}} (\text{mg})}$$

Afin d'évaluer le pourcentage de perte de l'oligonucléotide, il suffit de faire le ratio entre quantité d'oligonucléotides perdue et la charge du support :

$$\% \text{ de perte} = \frac{Q^{\text{té}} \text{ perdue } (\mu\text{mol.g}^{-1}) \times 100}{\text{Charge de la résine en ON } (\mu\text{mol.g}^{-1})}$$

**c. Décrochage du support et déprotection des bases**

La résine est versée dans un tube eppendorf et immergée dans une solution ammoniacuée aqueuse 28% (0,5 mL) pendant une nuit à 55°C.

**d. Purification des oligonucléotides**

Le protocole utilisé est identique à celui donné p.190

**e. Dessalage après purification HPLC**

Le protocole utilisé est identique à celui donné p.191

#### 4. Test de déprotection des groupements Npeoc sur support solide

##### a. Détermination du coefficient molaire $\epsilon_{303 \text{ nm}}$ du nitrostyrène dans l'acétonitrile

À partir d'une solution mère de nitrostyrène 1 mM dans l'acétonitrile sont réalisés les échantillons suivants (volume final = 1 mL) :

Échantillon	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Volume de solution mère prélevé ( $\mu\text{L}$ )	Volume d'acétonitrile ( $\mu\text{L}$ )
1	10	10	990
2	20	20	980
3	30	30	970
4	40	40	960
5	50	50	950

Un dosage UV des différentes solutions entre 280 nm et 400 nm permet d'établir un maximum pour une longueur d'onde de 303 nm. La pente de la droite obtenue pour le tracé de  $A_{303} = f(\text{concentration})$  représente le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{303 \text{ nm}}$  du nitrostyrène dans l'acétonitrile.  $\epsilon_{303 \text{ nm}} = 12809 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

##### b. Suivi de la déprotection des Npeoc sur support solide en fonction du temps

Sur un support solide comprenant 4 spermines (40,8 mg), dont la quantité de nitrostyrène à libérer est estimée à 10  $\mu\text{mol}$ , est versée une solution de DBU 1M (400  $\mu\text{L}$ ). Aux intervalles de temps suivants : t+15 min, t+30 min, t+1h, t+2h, t+4h, t+19h, 10  $\mu\text{L}$  de solution sont prélevés et complétés par QSP 100  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile. L'échantillon est alors dilué à nouveau au 1 / 100<sup>e</sup> (10  $\mu\text{L}$  dans QSP 1000  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile) puis dosé en UV à 303 nm. Il est alors possible de calculer le nombre de moles de nitrostyrène libérées en fonction du temps.

$$n_{\text{nitrostyrène}} = \frac{A_{303 \text{ nm}} \times (V_i - 10 \text{ k})}{\epsilon_{303} \times l}$$

où  $V_i$  est le volume initial (400  $\mu\text{L}$ ), k est le nombre de prélèvements effectués, l est le trajet optique de la cuve UV.

## D. Caractérisation des oligonucléotides conjugués à des guanidino-spermines

### 1. Caractérisation en masse

Comme cela a été rapporté précédemment (p.160), les oligonucléotides ont été caractérisés en masse par ESI ou MALDI-TOF.

### 2. Caractérisation par HPLC

Les oligonucléotides ont tous été caractérisés par HPLC selon les conditions suivantes :

1. Oligonucléotides conjugués modifiés en 5' : la colonne utilisée est une colonne DNA Pac 100 analytique (4 mm x 250 mm). L'échantillon est élué avec un débit de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  grâce un gradient en solution de NaCl 1M : 30% à 100% en 20 min, avec un régime isocratique en  $\text{NH}_3$  0,1 M + 10% d'acétonitrile.
2. Oligonucléotides conjugués modifiés en 3' : la colonne utilisée est une colonne DNA Pac 100 analytique (4 mm x 250 mm). L'échantillon est élué avec un débit de  $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  grâce un gradient en solution de KBr 1,5 M : 10% à 25% en 5 min, 25% à 35% en 10 min, avec une concentration en NaOH constante (25 mM).

### 3. Mesures des températures de fusion

#### a. Mesure des $T_m$ en présence de $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$

Les échantillons sont préparés dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM. Les deux brins sont ajoutés de façon à avoir une concentration finale de  $1 \mu\text{M}$  en duplex. Les échantillons sont ensuite chauffés 20 min. à  $95^\circ\text{C}$  sur le spectrophotomètre dans des cuves en quartz (1 mL) puis refroidis à  $20^\circ\text{C}$  à une vitesse de  $0,7^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . L'acquisition des données est effectuée tous les  $0,5^\circ\text{C}$ . La montée en température jusqu'à  $90^\circ\text{C}$  s'effectue par la suite à la même vitesse, avec le même délai d'acquisition des données. Les résultats sont ensuite traités avec le logiciel Thermal (Cary WinUV, Varian).

**b. Mesure des  $T_m$  en présence de  $[NaCl] = 50 \text{ mM}$** 

Les échantillons sont préparés dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 50 mM. Les deux brins sont ajoutés de façon à avoir une concentration finale de 2  $\mu\text{M}$  en duplex. Les échantillons sont ensuite chauffés 20 min à 95°C sur le spectrophotomètre dans des cuves en quartz (1 mL) puis refroidis à 20°C à une vitesse de 0,7°C.min<sup>-1</sup>. L'acquisition des données est effectuée tous les 1°C. La montée en température jusqu'à 90°C s'effectue par la suite à la même vitesse, avec le même délai d'acquisition des données. Les résultats sont ensuite traités avec le logiciel Thermal (Cary WinUV, Varian).

## **IV. SYNTHÈSE D'OLIGONUCLEOTIDES POUR CORRECTION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF**

### **A. Synthèse des oligonucléotides cationiques**

#### **1. Synthèse d'oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates conjugués**

Les oligonucléotides sont synthétisés de façon automatisée sur un synthétiseur d'oligonucléotides en utilisant des phosphoramidites ARN 2'-OMe : le phosphoramidite 2'-OMe-Pac-A-CE, le phosphoramidite 2'-OMe-Ac-C-CE, le phosphoramidite 2'-OMe-iPr-Pac-G-CE et le phosphoramidite 2'-OMe-U-CE, auxquels s'ajoutent le phosphoramidite spermine. Les réactifs 2'-OMe (0,5 g) sont dissous dans de l'acétonitrile anhydre (10 mL) alors que la spermine (0,5 g) est dissoute dans 6 mL d'acétonitrile. Toutes les phosphoramidites sont séchées une nuit sur tamis moléculaire. Les supports adoptés pour la synthèse ne sont pas 2'-OMe, il s'agit de la dA-CPG, dC-CPG, la dT-CPG. ). Les oligonucléotides marqués par la fluorescéine ([ON705]Fluo et S<sub>20</sub>[ON705]Fluo) ont été synthétisés par Mitsuharu Kotera, en utilisant un support 6-fluorescéine carboxamide CPG. L'activateur employé pour ces synthèses est le BTT, le réactif de sulfuration est le réactif de Beaucage (3H-1,2-Benzodithiole-3-one-1,1-dioxide) dissous dans l'acétonitrile anhydre à raison de 1 g pour 100 mL, les réactifs de cap sont Pac<sub>2</sub>O dans le THF (cap Mix A) et la *N*-méthylimidazole dans le THF et la pyridine (1 : 8 : 1, cap Mix B). Les synthèses sont effectuées en modifiant le protocole standard d'1  $\mu\text{mol}$  : 1) Le volume d'acétonitrile après le

cycle de détritylation est augmenté à 4 mL, 2) Le temps de sulfuration est de 3 min, 3) le cycle de cap est allongé à 3 min, 4) la quantité de spermine phosphoramidite pour la jonction oligonucléotide-polyamine est multipliée par deux et le temps de couplage des spermines s'élève à 15 min. Chaque synthèse est accomplie en gardant le DMT final pour purification ultérieure des oligonucléotides.

## 2. Déprotection des oligonucléotides et décrochage du support

La résine comportant l'oligonucléotide est transvasée dans un tube eppendorf à vis et 0,5 mL d'une solution d'ammoniac concentré 28% est ajoutée. La réaction est laissée une nuit à température ambiante.

## 3. Purification des oligonucléotides

Les oligonucléotides sont purifiés sur cartouche PolyPak II en modifiant le protocole standard de la façon suivante : l'élution des séquences tronquées est effectuée par une solution d'ammoniac diluée au 1/10<sup>e</sup> et l'élution finale des composés détritylés est réalisée par une solution d'acétonitrile 20% (1 mL) puis par une solution d'ammoniac diluée au 1/10<sup>e</sup> (2 x 1 mL). Les fractions contenant l'oligonucléotide sont alors rassemblées et lyophilisées puis dissoutes à nouveau dans de l'eau mQ pour dosage en UV à 260 nm. Les oligonucléotides sont ensuite conservés à -20°C.

## B. Caractérisation des oligonucléotides sur gel PAGE

Cette caractérisation a été effectuée par Marc Nothisen.

Chaque oligonucléotide (400 pmol) est déposé sur un gel précoulé Criterion™ XT de gradient 4-12% Bis-Tris (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) et mis à migrer sur un système Criterion™ Cell (Bio-Rad) pendant 100 min à 90V, en présence de tampon de migration XT MES. Les photos des gels sont prises après incubation pendant 30 min dans un bain de bromure d'éthidium dans de l'eau mQ.

## C. Biologie cellulaire

Toutes les expériences de biologie cellulaire ont été effectuées par Marc Nothisen.

La lignée cellulaire HeLa pLuc705 a été transfectée de manière stable avec un plasmide pLuc/705 dans lequel l'intron 2 muté IVS2-705 de la  $\beta$ -globine observé dans les cas de  $\beta$ -thalassémie a été inséré dans le gène de la luciférase, ce dernier servant de gène reporter. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Eurobio, les Ulis, France) en présence de 10 % de sérum fœtal de bovin (FBS) (Perbio, Brebieres, France), de 100 U/mL de pénicilline, de 100  $\mu$ g/mL de streptomycine (Eurobio), et de 200  $\mu$ g/mL d'hygromycin B (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### 1. Pénétration cellulaire d'un oligonucléotide cationique fluorescent

Des cellules HeLa pLuc705 sontensemencées 24 h avant l'expérience, dans des chambres de culture quatre puits (Lab-Tek 155383, Thermo-scientific) à raison de  $5.10^4$  cellules par puits, dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'oligonucléotides fluorescents ( $S_{20}$ [ON-705]fluo et [ON-705]fluo) dilués dans 0,3 mL de milieu sans sérum, à des concentrations de 0,4  $\mu$ M et 1  $\mu$ M. À 45 min, 2 h et 4 h, le milieu de culture est remplacé par 0,5mL de MEM sans rouge de phénol et les cellules sont observées sous un microscope à épifluorescence (Axiovert, Zeiss, NY, États-unis).

### 2. Étude de la spécificité et de l'efficacité des oligonucléotides antisens cationiques

#### a. Essais de transfection

Vingt quatre heures avant transfection des oligonucléotides cationiques sans vecteurs, les cellules sontensemencées à raison de  $5.10^4$  cellules par puits dans 1 mL de milieu DMEM complet avec 10% de sérum dans des plaques 24 puits. Avant dépôt des oligonucléotides, le milieu complet est enlevé et remplacé par 300 $\mu$ L de milieu DMEM sans sérum dans lequel les oligoribonucléotides cationiques ont été préalablement dilués à la concentration souhaitée.

Tous les essais sont réalisés en triplicats (ou duplicats pour l'expérience supplémentaire de détermination des concentrations optimales pour l'oligonucléotide S<sub>20</sub>[ON-705]). Après 4 h d'incubation, 700 µL de milieu complet contenant 14,3% de sérum sont ajoutés et les cellules remises en culture à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> (C<sub>finale en sérum</sub> = 10%). Au temps souhaité, chaque échantillon cellulaire est lysé dans les conditions données ci-après.

**b. Dosage des protéines cellulaires et quantification de l'expression de la luciférase**

Après élimination du milieu de culture, les cellules sont rincées par du PBS (phosphate buffer saline, 2 x 1 mL) puis lysées avec 100 µL/puits de tampon de lyse (Promega, Charbonnières, France), à température ambiante, pendant 30min. Les lysats sont collectés et centrifugés pendant 5min à 17000 x g. La mesure de l'activité de la luciférase s'effectue sur 10 µL de surnageant, auxquels sont ajoutés 50 µL de solution de luciférine (Promega), dans un luminomètre Centro LB960 (Berthold).

La mesure des protéines totales s'effectue à l'aide d'un kit BCA (Uptima, Interchim). Une gamme de concentrations en BSA (albumine sérique bovine) est préparée afin de servir d'étalonnage (15 µL de tampon de lyse sont ajoutés pour chaque échantillon de BSA). Pour nos échantillons, 15 µL de lysat sont prélevés et 1 mL de BCA mix est ajouté. Les solutions ainsi préparées sont chauffées 30 min à 60°C puis dosées en UV à 562 nm à l'aide de cuves en plastique. L'activité finale de la luciférase est exprimée en RLU (relative light units) par milligramme de protéines cellulaires totales (RLU/mg protéines), rapportées aux RLU/mg protéines de la lignée HeLa pLuc705. Le rapport des valeurs est exprimé en pourcentage par rapport à chaque point de la lignée non-traitée.

3. Étude cinétique des oligonucléotides antisens cationiques aux concentrations optimales

**a. Essais de transfection**

Vingt quatre heures avant transfection des oligonucléotides cationiques sans vecteurs, les cellules sontensemencées à raison de 5.10<sup>4</sup> cellules par puits dans 1 mL de milieu DMEM complet avec 10% de sérum dans des plaques 24 puits. Avant dépôt des oligonucléotides, le milieu complet est enlevé et remplacé par 300µL de milieu DMEM sans sérum dans lequel les oligoribonucléotides cationiques ont été préalablement dilués à la concentration souhaitée.

Tous les essais sont réalisés en duplicats. Après 4 h d'incubation, 700  $\mu$ L de milieu complet contenant 14,3% de sérum sont ajoutés et les cellules remises en culture à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> ( $C_{\text{finale en sérum}} = 10\%$ ). Après 11 h, 21 h et 45 h, un duplicat de chaque condition est lysé dans les conditions données ci-après, puis conservé à -80°C. Après 69 h, les cellules contenues dans la dernière plaque 24 puits, sont lavées au PBS, décollées avec 50 $\mu$ L de trypsine, reprises dans du milieu DMEM complet et réparties dans de nouvelles plaques 24 puits, de manière à obtenir un duplicat par plaque pour chaque condition. Après 76 h, 95 h, 118 h et 142h, un duplicat de chaque condition est lysé comme suit.

**b. Dosage des protéines cellulaires et quantification de l'expression de la luciférase**

Le dosage des protéines cellulaires et la quantification de l'expression de la luciférase s'effectuent de la même façon que pour l'étude de la spécificité des oligonucléotides cationiques (p.201).

## V. OLIGONUCLEOTIDES LIPOPHILES CATIONIQUES

### A. Synthèse des siRNAs cationiques lipophiles

La synthèse et la purification des siRNAs cationiques lipophiles ont été réalisées par Jérémy Bagilet.

**a. Synthèse des siRNAs cationiques lipophiles**

La synthèse des oligonucléotides ARN cationiques lipophiles a été réalisée de façon automatisée sur synthétiseur d'oligonucléotides. Le protocole standard de synthèse d'ARN à l'échelle d'1  $\mu$ mol a été modifié de façon à ce que : 1) le volume d'acétonitrile de rinçage après passage de la solution de TCA soit augmenté (volume total de la fraction de DMT : *ca* 4 mL) pour récupérer correctement tout le DMT, 2) le temps du cycle de cap soit rallongé à 3 min, 3) le temps de couplage de la spermine soit accru (4 min), 4) le temps de couplage des phosphoramidites 5'-cholesteryl-TEG ou spacer C<sub>12</sub> soit augmenté à 15 min. La séquence GL3ss programmée pour la synthèse des oligonucléotides ARN correspond aux nucléotides 154 à 172 du gène modifié de la luciférase de la luciole *Photinus Pyralis*. Cette séquence est la

suivante : 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3'. Tous les oligonucléotides ont été synthétisés en conservant le DMT final pour purification ultérieure. Les rendements de couplages moyens étaient >97% pour le couplage des nucléotides ARN (protection TOM) et >95% pour le couplage des spermines ainsi que des modifications lipidiques cholesteryl et C<sub>12</sub> (ces derniers rendements de couplage ont été estimés à l'aide de colonnes tests).

### b. Clivage du support et déprotection

Le clivage des oligonucléotides du support et la déprotection des bases et 2'-OH ont été accomplis selon le protocole <http://www.glenresearch.com//GlenReports/GR19-2.pdf> donné par le fabricant, avec pour seule modification, l'allongement à une nuit de la durée de déprotection par le mélange EMAM. Pour la purification, les modifications suivantes sont apportées au protocole standard (manuel Glen-Pak™ cartridges) : avant de déposer l'oligonucléotide, 1 mL d'acétonitrile et 1 mL de solution de TEAA pH = 7 sont passés sur la colonne, et l'élution finale a été effectuée par :

1. une solution NH<sub>3</sub> (1/20<sup>e</sup>) : acétonitrile 70 : 30 pour CholS<sub>30</sub>[GL3ss] et (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>[GL3ss] suivie par une neutralisation à l'acide acétique 2,5M (50 µL),
2. une solution 0,07 M NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>/70 % acétonitrile pour Chol[GL3ss],
3. une solution 0,07 M NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>/30 % acétonitrile pour les autres échantillons.

Les fractions contenant l'oligonucléotide sont regroupées et lyophilisée sur un évaporateur Speed Vacc. L'oligonucléotide est alors dissous dans de l'eau « RNase free », dosé en UV à 260 nm [255] puis conservé à - 80°C. Les oligonucléotides GL3as et GL3ss sans spermines ni parties lipophiles ont été fournis par la société Eurogentec.

### c. Hybridation des siRNAs

Les duplex suivants : S<sub>30</sub>GL3, CholS<sub>30</sub>GL3, C<sub>12</sub>S<sub>30</sub>GL3, (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>S<sub>30</sub>GL3, CholGL3, C<sub>12</sub>GL3, (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>GL3 et le duplex témoin GL3 ont été réalisés par hybridation des brins sens GL3ss lipophiles et/ou cationiques avec le brin antisens GL3as dans de l'eau « RNase free » par chauffage à 93°C pendant 2 min puis refroidissement lent à température ambiante pendant 1 h. La concentration finale en solution mère de chaque siRNA est de 20 µM.

## B. Caractérisation des oligonucléotides

### 1. Analyse par gel d'électrophorèse

Un gel d'électrophorèse a été réalisé pour caractériser et vérifier la pureté des oligonucléotides conjugués et des duplex correspondants. Pour cela, 200 pmol d'ARN simple/double brin(s), respectivement 5  $\mu\text{L}$  et 10  $\mu\text{L}$  de solution sont mélangés avec du tampon de Laemmli (respectivement 5  $\mu\text{L}$  et 10  $\mu\text{L}$ , dilution finale du tampon : 1/25<sup>e</sup>) puis déposés dans les puits d'un gel bis-Tris de gradient 4-12% (Invitrogen, Grand Island, NY, États-Unis). La migration du gel est accomplie en condition dénaturante en 90 min pour une tension de 120 V, à l'aide d'un appareillage Xcell SureLock™ Mini cell (Invitrogen), en utilisant un tampon de migration MOPS SDS 1x (Invitrogen). Le gel est ensuite révélé par UV et par marquage au bromure d'éthidium.

### 2. Observations en microscopie électronique en transmission

Les observations en microscopie électronique ont été réalisées par Jean-Serge Remy et Emmanuelle Morin.

#### a. Caractérisation des siRNAs

Les échantillons contenant les siRNAs (10  $\mu\text{L}$ , 100 nM) dans un milieu sans sérum (Opti-MEM, Invitrogen, Grand Island, NY, États-Unis) sont absorbés pendant 1 min sur grille de cuivre recouverte d'un film de formvar 300 mesh (Ted Pella, Redding, CA, États-Unis). L'excès de solvant est absorbé à l'aide de papier Whatman en prenant soin de ne pas toucher la surface de la grille. Les échantillons sont ensuite marqués par une solution aqueuse d'acétate d'uranyle 2% pendant 20 s avant d'être observés en microscopie électronique.

#### b. Caractérisation de l'association des siRNAs cationiques lipophiles à l'albumine

De façon identique aux expériences de biologie cellulaire, les siRNAs sont pré-associés à l'albumine à une concentration de 600 nM pendant 30 minutes. Deux concentrations différentes en albumine ont été testées dans cette expérience : 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , comme pour les expériences en biologie cellulaire, et 0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Après 30 min, les échantillons sont dilués

à 100 nM par de l'Opti-MEM (Invitrogen) et déposés sur les grilles comme décrit précédemment.

### 3. Caractérisation par spectrométrie de masse

Les oligonucléotides cationiques lipophiles ont été identifiés en masse par MALDI-TOF comme indiqué précédemment (p.160).

## C. Biologie cellulaire

Les cellules utilisées sont des cellules A549 (carcinome pulmonaire humain ; réf. ATCC : CCL-185) transformées à l'aide d'un plasmide pGL3Luc (Clontech, Mountain View, CA, Etats-Unis) transfecté par du jetPEI (Polyplus-transfection, Illkirch, France) pour exprimer de façon stable le gène GL3 de la luciférase de *Photinus pyralis* et un gène de résistance à un antibiotique, sous le contrôle du promoteur SV40. Ces cellules adhérentes recombinantes, appelées A549Luc, sont cultivées à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 (Eurobio, Courtaboeuf, France) contenant de la L-glutamine (2 mM), complété par 10% de sérum de veau fœtal (Perbio, Brebières, France), 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline (Eurobio), 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine (Eurobio). Elles sont maintenues sous pression de sélection avec 0,8 µg.mL<sup>-1</sup> de l'antibiotique aminoglycosidique G-418 (Promega).

### 1. Expérience en l'absence de sérum

Vingt-quatre heures avant le début de l'expérience, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits (Réf. 3526, Corning, NY, États-unis) à raison de 25000 cellules par puits dans 1 mL de milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal et laissées à incuber à 37°C. La quantité requise de siRNAs est dissoute soit dans 100 µL de milieu sans sérum Opti-MEM (Invitrogen) soit dans 100 µL d'une solution filtrée (0,2 µm) d'albumine (Réf. A2153, Sigma, Lyon, France) dans de l'eau « RNase free » à 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Pour favoriser l'association des siRNAs cationiques lipophiles avec l'albumine, ces derniers échantillons sont préalablement mélangés à la protéine et incubés 30 min avant dépôt sur les cellules. Chaque échantillon est réalisé en duplicat. Un contrôle positif est réalisé par transfection de

siRNAs GL3 ( $C_{\text{finale}} = 10 \text{ nM}$ ) dilués dans  $100 \mu\text{L}$  d'Opti-MEM et complexé pendant 10 min avec  $1,2 \mu\text{L}$  d'un vecteur de référence : l'INTERFERin™ (Polyplus-Transfection, Illkirch, France). En présence d'albumine, ce témoin est réalisé comme suit : la quantité nécessaire de siRNAs est mise à complexer avec  $1,2 \mu\text{L}$  d'INTERFERin™ pendant 10 min puis est diluée à  $100 \mu\text{L}$  par la solution d'albumine à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  et laissée 30 min à interagir. Avant dépôt des échantillons dans les puits, le milieu complet est retiré et remplacé par  $0,5 \text{ mL}$  de milieu RPMI 1640 sans sérum après rinçage des puits par du PBS ( $2 \times 1 \text{ mL}$ , Eurobio, Courtaboeuf, France). Après 4 h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  en présence des siRNAs,  $0,5 \text{ mL}$  de milieu RPMI contenant 20% de sérum est déposé sur les cellules. Les plaques sont alors laissées à  $37^\circ\text{C}$ , en présence de 5% de  $\text{CO}_2$ , jusqu'à  $t+48 \text{ h}$ .

## 2. Expérience en présence de sérum

Les expériences en présence de sérum ont été exécutées de la même façon qu'en absence de sérum. La seule modification notable par rapport au protocole précédent vient du fait que les cellules sont dans  $0,5 \text{ mL}$  de milieu RPMI avec 10% de sérum de veau fœtal avant ajout des siRNAs. Par souci d'homogénéité avec les conditions expérimentales sans sérum,  $0,5 \text{ mL}$  de milieu RPMI contenant 10% de sérum est à nouveau ajouté après 4 h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ .

## 3. Analyse de la luciférase et dosage des protéines cellulaires

Après avoir enlevé le milieu de culture, les cellules sont rincées avec du PBS ( $2 \times 1 \text{ mL}$ ) puis lysées avec  $100 \mu\text{L}$  de tampon de lyse 1x (Cell Culture Lysis Reagent 5x dilué dans de l'eau « RNase free »), Promega, Charbonnières, France) à température ambiante pendant 30 min. Les lysats sont collectés puis centrifugés à  $17000 \times g$  pendant 5 min.

L'expression de la luciférase est quantifiée grâce aux photons émis lors de la réaction enzymatique entre la protéine et son substrat, la luciférine (Luciferase Assay Substrate, Promega, Charbonnières, France). La mesure est donc effectuée grâce à un luminomètre Centro LB960 (Berthold, Thoiry, France) en prélevant  $2 \mu\text{L}$  de surnageant provenant des lysats centrifugés et en leur ajoutant  $50 \mu\text{L}$  de luciférine. L'expression de la luciférase est alors exprimée en RLU intégrées pour 10 s par mg de protéines cellulaires ( $\text{RLU.mg}^{-1}$ ). Le pourcentage d'expression du gène de la luciférase est calculé par rapport à l'activité des cellules A549Luc témoins, non transfectées.

La quantité en protéines solubles est mesurée en parallèle par dosage avec l'acide bicinchoninique (kit BC Assay, Uptima, Interchim, Montluçon, France). Une gamme de concentration en BSA (sérum albumine bovine) est préparée afin de servir d'étalonnage (15 µL de tampon de lyse sont ajoutés pour chaque échantillon de BSA). Pour nos échantillons, 15 µL de lysat sont prélevés et 1 mL de BCA mix est ajouté. Les solutions ainsi préparées sont chauffées 30 min à 60°C puis dosées en UV à 562 nm à l'aide de cuves en plastique.



# Abréviations



<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
A	Adénine
A	Absorbance
AAV	Virus adéno-associé
Ac	Acétyl
AcOEt	Acétate d'éthyle
Ac <sub>2</sub> O	Anhydride acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
APCI	ionisation chimique à pression atmosphérique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
as	brin antisens
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Acide bicinchonique
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BSA	Albumine sérique bovine
BTT	5-benzylthio-1H-tetrazole
C	Cytosine
C	Concentration
C <sup>IV</sup>	Carbone quaternaire
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDI	Carbonyl diimidazole
Chol	Cholesteryl
CPG	Controlled pore glass (matrice de verre à taille de pore contrôlée)
CPP	Cell-penetrating peptide (peptide de pénétration cellulaire)
CyH	Cyclohexane
d	doublet
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
DIC	Diisopropyl carbodiimide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMT	Diméthoxytrityle
DNG	Deoxynucleic guanidine
DOGS	Dioctadécylamidoglycyl spermine
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-triméthylammonium propane
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -triméthylammonium
DOSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(6-carboxyspermyl)-propylamide
$\epsilon$	Coefficient d'extinction molaire
EDCI	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Effet EPR	Effet de perméabilité et de rétention amélioré
EMAM	Méthylamine éthanolique/Méthylamine aqueuse
ESI	Ionisation électrospray
Ex	Exemple
Fmoc	9-Fluorenylméthoxycarbonyle
G	Guanidine
GS	Guanidinospermine
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
HSPG	Héparane sulfate protéoglycane
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infrarouge
<i>l</i>	Longueur du trajet optique
lcaa	Long chain alkylamino
LNA	Locked Nucleic Acid
<i>m</i>	Multiplet
MALDI	Ionisation désorption laser assistée par matrice
<i>N</i> -MeIm	<i>N</i> -méthylimidazole
MeOH	Méthanol
MEM	Modified Eagle Medium

Mes	2,4,6-triméthylphényle
<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
MES	Acide 2-( <i>N</i> -morpholino)-éthanesulfonique
MET	Microscopie à transmission d'électron
MGB	Minor Groove binder (molécule de liaison au petit sillon)
miRNA	Micro-RNA
2'-MOE	2'- <i>O</i> -Méthoxyéthyle
MOPS	Acide 3-( <i>N</i> -morpholino)-propanesulfonique
MMT	Monométhoxytrityle
MS	Spéctrométrie de masse
MSD	détecteur sélectif de masse
N	Nucléotide
n.d.	non déterminé
Npeoc	2-(4-nitrophényl)-éthoxycarbonyl
2'-OMe	2'- <i>O</i> -Méthyle
Pac	Phénoxyacétyle
Pac <sub>2</sub> O	Anhydride phénoxyacétique
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PAMAM	Polyamidoamine
Pbf	2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofurane-5-sulfonyle
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PKC	Protéine Kinase C
PMA	Acide phosphomolybdique
PMO	Morpholinos phosphorodiamidates
PNA	Peptide Nucleic Acid
Pri-miRNA	micro ARN primaire
Pre-miRNA	micro ARN précurseur
PS	Phosphorothioate
q	Quadruplet
QSP	Quantité Suffisante Pour

R	Rendement
<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
Réf.	Référence
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RLU	Relative light units
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
$R_{\text{moy. coupl.}}$	Rendement moyen de couplage
s	Singulet
S	Spermine
SDS	Sodium Dodécyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
ss	Brin sens
t	Triplet
T	Thymine
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyle
TCA	Acide trichloroacétique
TEG	Triéthylène glycol
TFA	Trifluoroacétyle/acide trifluoroacétique
TFO	Triplex Forming Oligonucléotide
TOF	Temps de vol
$T_m$	Température de fusion
TMS	Triméthylsilane
U	Uracile
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ZNA	Zip Nucleic acid

# Liste des figures et tableaux



# Liste des figures

Figure 1 : Interactions de Watson-Crick et structure de l'ADN .....	8
Figure 2 : Schéma général de la synthèse des protéines .....	9
Figure 3 : Étape de transcription .....	10
Figure 4 : Épissage du pré-ARNm .....	10
Figure 5 : Traduction de l'ARNm en protéines .....	11
Figure 6 : Répartition des essais cliniques de thérapie génique (2009) .....	12
Figure 7 : Amplification d'une séquence cible par PCR .....	14
Figure 8 : Principe de la puce à ADN .....	15
Figure 9 : Triple hélice d'ADN formée à l'aide d'un oligonucléotide .....	16
Figure 10 : Représentation d'une invasion de brin par un oligonucléotide .....	17
Figure 11 : Principe général de la stratégie antisens .....	18
Figure 12 : Mécanisme d'ARN interférence.....	19
Figure 13 : Mécanisme d'ARN interférence par les miRNAs.....	21
Figure 14 : Production <i>in vivo</i> d'ARN interférents.....	22
Figure 15 : Stratégies principales de ciblage de l'ARN pré-messager .....	23
Figure 16 : Composition de la membrane cellulaire .....	25
Figure 17 : Organes "filtres" de l'organisme .....	26
Figure 18 : Vecteurs les plus utilisés en thérapie génique (2009).....	28
Figure 19 : Schéma d'un liposome .....	31
Figure 20 : Lipides cationiques .....	31
Figure 21 : Internalisation cellulaire médiée par un vecteur synthétique, la PEI.....	32
Figure 22 : Mécanisme d'éponge à protons.....	33
Figure 23 : Structure des dendrimères PAMAM .....	34
Figure 24 : Sites de modification des oligonucléotides.....	38
Figure 25 : Structure des oligonucléotides phosphorothioates.....	39
Figure 26 : Modifications du groupement phosphate.....	40
Figure 27 : Comparaison de la structure des DNG et des oligonucléotides ADN.....	41
Figure 28 : Structure des LNA .....	42
Figure 29 : Modifications en position 2' du sucre .....	43

Figure 30 : Guanine modifiée à l'aide d'une spermine .....	44
Figure 31 : 7-déazaguanosine.....	45
Figure 32 : Structure des bases modifiées 7-déazaxanthine et 6-thioguanine.....	45
Figure 33 : Structure des oligonucléotides morpholinos.....	46
Figure 34 : Structure des acides nucléiques peptidiques.....	47
Figure 35 : Conjugaisons possibles des parties lipidiques .....	49
Figure 36 : Couplages des spermines à l'extrémité 5' ou 3' d'un oligonucléotide .....	53
Figure 37 : Internalisation cellulaire d'un oligonucléotide ADN cationique S <sub>18</sub> [N] <sub>19</sub> fluorescent .....	54
Figure 38 : Synthèse du phosphoramidite spermine .....	59
Figure 39 : Le groupement guanidine .....	60
Figure 40 : Structure de la nouvelle génération d'oligonucléotides conjugués.....	61
Figure 41 : Synthèse de la spermine tétra-trifluoroacétylée 1.....	62
Figure 42 : Synthèse de la spermine tétraprotégée 2.....	63
Figure 43 : Migration des groupements trifluoroacétyles sur les amines primaires .....	63
Figure 44 : Synthèse de la spermine diprotégée 3.....	63
Figure 45 : Déprotection des groupements Npeoc et libération de nitrostyrène.....	64
Figure 46 : Synthèse du carbonate 4 .....	64
Figure 47 : Synthèse de la spermine tétraprotégée 5.....	64
Figure 48 : Introduction du groupement protecteur MMT dosable en visible.....	65
Figure 49 : Obtention du produit mono-détritylé 7 .....	66
Figure 50 : Introduction de la fonction thiourée .....	66
Figure 51 : Schéma de synthèse de la thiourée 8 .....	67
Figure 52 : Déprotection des groupements Npeoc par une solution de DBU 1 M .....	68
Figure 53 : Déprotection du groupement Fmoc et libération de méthylènefluorène .....	69
Figure 54 : Déprotection des groupements Fmoc par une solution de DBU 3% .....	70
Figure 55 : Groupement DMT .....	71
Figure 56 : Cycle de couplage d'un nucléotide .....	72
Figure 57 : 5'-Amino-modifier-C6 .....	73
Figure 58 : Spectre HPLC brut du couplage de l' amino-modifier.....	73
Figure 59 : Couplage de spermine sur décàmère amino-modifié.....	75
Figure 60 : Activateurs testés pour la réaction de guanidinylation .....	76
Figure 61 : Mécanismes de formation de la fonction guanidine .....	77
Figure 62 : Substitution nucléophile .....	78

Figure 63 : Décamère conjugué en 5' à une spermine.....	81
Figure 64 : Introduction d'une fonction amine sur le support dT-CPG.....	83
Figure 65 : Synthèse de la diamine mono-protégée 9 .....	83
Figure 66 : Cycle de synthèse de guanidospermines sur support dT-CPG aminomodifié....	85
Figure 67 : Méthodes de déprotection de l'oligonucléotide-guanidospermine(s) .....	87
Figure 68 : Déprotection des groupements Npeoc sur support solide.....	88
Figure 69 : Décrochage de l'oligonucléotide du support par une solution de DBU .....	89
Figure 70 : Support sarcosyl-succinyl .....	90
Figure 71 : Couplage de la sarcosine sur lcaa-CPG .....	91
Figure 72 : Synthèse du succinate 10 .....	92
Figure 73 : Couplage du succinate 10 sur support sarcosyl .....	92
Figure 74 : Synthèse de la molécule de liaison 12 .....	93
Figure 75 : Test de couplage de la thiourée 12 sur le support sarcosyl-succinyl.....	93
Figure 76 : Synthèse des supports GS <sub>1</sub> , GS <sub>2</sub> et GS <sub>3</sub> .....	94
Figure 77 : Insertion de la fonction alcool pour couplage de l'oligonucléotide .....	95
Figure 78 : Synthèse de l'oligonucléotide "modèle" [N] <sub>10</sub> G <sub>1</sub> .....	96
Figure 79 : Synthèse d'oligonucléotide sur support GS <sub>1</sub> .....	97
Figure 80 : Spectre HPLC du produit [N] <sub>10</sub> G <sub>1</sub> .....	98
Figure 81 : Caractérisation du produit de cyclisation des guanidospermines .....	99
Figure 82 : Principe général d'ionisation par nébulisation .....	101
Figure 83 : Principe de désorption-ionisation assistée par matrice .....	102
Figure 84 : Détermination de la température de fusion (T <sub>m</sub> ) d'un ADN double brin.....	104
Figure 85 : Courbes et températures de fusion pour [NaCl] = 150 mM .....	105
Figure 86 : Courbes et températures de fusion pour [NaCl] = 50 mM .....	106
Figure 87 : Schéma général des oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates cationiques ...	114
Figure 88 : Gel d'électrophorèse des oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates. ....	117
Figure 89 : Pénétration cellulaire d'un oligonucléotide cationique S <sub>20</sub> [ON-705]Fluo.....	119
Figure 90 : Modèle de gène rapporteur .....	120
Figure 91 : Étude de l'efficacité et de la spécificité des oligonucléotides cationiques.....	121
Figure 92 : Restauration de l'expression du gène de la luciférase par l'oligonucléotide S <sub>20</sub> [ON-705] .....	122
Figure 93 : Cinétique de rétablissement de l'expression de la luciférase .....	124
Figure 94 : Efficacité et cinétique d'action des oligonucléotides S <sub>20</sub> [ON-705] et [ON-705] transfecté .....	124

Figure 95 : Oligonucléotide cationique et ses analogues lipidiques .....	131
Figure 96 : Analyse par gel d'électrophorèse de l'hybridation des siRNAs cationiques.....	135
Figure 97 : Gel d'électrophorèse des oligonucléotides cationiques lipophiles.....	136
Figure 98 : Schéma de fonctionnement d'un microscope électronique en transmission.....	138
Figure 99 : Images de MET des siRNAs.....	139
Figure 100 : Images de MET en présence d'albumine (10 mg.mL <sup>-1</sup> ).....	141
Figure 101 : Images de MET en présence d'albumine (0,1 mg.mL <sup>-1</sup> ). .....	142
Figure 102 : Principe de la chromatographie d'exclusion de taille .....	143
Figure 103 : Principe d'évaluation de l'activité des siRNAs cationiques lipophiles .....	144
Figure 104 : Efficacité des siRNAs amphiphiles en l'absence de sérum .....	145
Figure 105 : Efficacité des siRNAs témoins seuls et transfectés par de l'INTERFERin™ ...	146
Figure 106 : Comparaison des activités des siRNAs avec et sans albumine .....	147
Figure 107 : Efficacité des siRNAs témoins en présence d'albumine.....	148
Figure 108 : Efficacité des siRNAs pré-incubés ou non sur l'albumine, en présence de sérum .....	149

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Essais cliniques en ARN interférence .....	20
Tableau 2 : Test de solvants pour la réaction de guanidinylation .....	75
Tableau 3 : Test d'activateurs pour la réaction de guanidinylation .....	78
Tableau 4 : Test de différentes bases pour la réaction de guanidinylation .....	79
Tableau 5 : Caractérisation des composés GS <sub>n</sub> [N] <sub>10</sub> (n = 1, 2 ou 3).....	90
Tableau 6 : Quantité isolée et caractérisation par masse.....	116
Tableau 7 : Caractérisation par spectrométrie de masse et quantités isolées .....	133

# Références bibliographiques



1. Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature* 171, 737-738.
2. Edelstein, M. L., Abedi, M. R., and Wixon, J. (2007) Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update, *The Journal of Gene Medicine* 9, 833-842.
3. Cai, X., Gray Jr, P. J., and Von Hoff, D. D. (2009) DNA minor groove binders: Back in the groove, *Cancer Treatment Reviews* 35, 437-450.
4. Chenoweth, D. M., Harki, D. A., Phillips, J. W., Dose, C., and Dervan, P. B. (2009) Cyclic Pyrrole-Imidazole Polyamides Targeted to the Androgen Response Element, *Journal of the American Chemical Society* 131, 7182-7188.
5. Opalinska, J. B., and Gewirtz, A. M. (2002) Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications, *Nat Rev Drug Discov* 1, 503-514.
6. Patil, S., Rhodes, D., and Burgess, D. (2005) DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review, *The AAPS Journal* 7, E61-E77.
7. Demidov, V. V., and Frank-Kamenetskii, M. D. (2001) Sequence-Specific Targeting of Duplex DNA by Peptide Nucleic Acids via Triplex Strand Invasion, *Methods* 23, 108-122.
8. Nielsen, P. E., and Egholm, M. (2001) Strand displacement recognition of mixed adenine-cytosine sequences in double stranded DNA by thymine-Guanine PNA (Peptide nucleic acid), *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9, 2429-2434.
9. Lohse, J., Dahl, O., and Nielsen, P. E. (1999) Double duplex invasion by peptide nucleic acid: A general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11804-11808.
10. Walder, R. Y., and Walder, J. A. (1988) Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5011-5015.
11. Chen, X., Dudgeon, N., Shen, L., and Wang, J. H. (2005) Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development, *Drug Discovery Today* 10, 587-593.
12. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391, 806-811.
13. Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes & Development* 15, 188-200.

14. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411, 494-498.
15. Reynolds, A., Anderson, E. M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W. S., and Khvorovova, A. (2006) Induction of the interferon response by siRNA is cell-type and duplex length-dependent, *RNA* 12, 988-993.
16. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature* 409, 363-366.
17. Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P. D. (2004) A Protein Sensor for siRNA Asymmetry, *Science* 306, 1377-1380.
18. Gredell, J. A., Dittmer, M. J., Wu, M., Chan, C., and Walton, S. P. (2010) Recognition of siRNA Asymmetry by TAR RNA Binding Protein, *Biochemistry* 49, 3148-3155.
19. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs, *Molecular Cell* 15, 185-197.
20. Whitehead, K. A., Langer, R., and Anderson, D. G. (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, *Nat Rev Drug Discov* 8, 129-138.
21. de Fougères, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007) Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* 6, 443-453.
22. Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D., and Ribas, A. (2010) Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature* 464, 1067-1070.
23. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature* 425, 415-419.
24. Novina, C. D., and Sharp, P. A. (2004) The RNAi revolution, *Nature* 430, 161-164.
25. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes & Development* 17, 3011-3016.
26. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004) Nuclear Export of MicroRNA Precursors, *Science* 303, 95-98.

27. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V. N. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, *EMBO J* 21, 4663-4670.
28. Zhang, B., Wang, Q., and Pan, X. (2007) MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants, *Journal of Cellular Physiology* 210, 279-289.
29. Wu, L., and Belasco, J. G. (2008) Let Me Count the Ways: Mechanisms of Gene Regulation by miRNAs and siRNAs, *Molecular Cell* 29, 1-7.
30. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. A., and Fire, A. (2001) On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing, *Cell* 107, 465-476.
31. Lipardi, C., Wei, Q., and Paterson, B. M. (2001) RNAi as Random Degradative PCR: siRNA Primers Convert mRNA into dsRNAs that Are Degraded to Generate New siRNAs, *Cell* 107, 297-307.
32. Stein, P., Svoboda, P., Anger, M., and Schultz, R. M. (2003) RNAi: Mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase, *RNA* 9, 187-192.
33. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells, *Genes & Development* 16, 948-958.
34. Manjunath, N., Wu, H., Subramanya, S., and Shankar, P. (2009) Lentiviral delivery of short hairpin RNAs, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 732-745.
35. Yu, J.-Y., DeRuijter, S. L., and Turner, D. L. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6047-6052.
36. Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., and Sharp, P. A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 457-467.
37. Sioud, M. (2005) Induction of Inflammatory Cytokines and Interferon Responses by Double-stranded and Single-stranded siRNAs is Sequence-dependent and Requires Endosomal Localization, *Journal of Molecular Biology* 348, 1079-1090.
38. Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., Endres, S., and Hartmann, G. (2005) Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7, *Nat Med* 11, 263-270.
39. Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA, *Nat Biotech* 23, 457-462.

40. Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M. A. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways, *Nature* 441, 537-541.
41. Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R., and Shoemaker, D. D. (2003) Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays, *Science* 302, 2141-2144.
42. Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C. W. J. (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 386-398.
43. Lopez-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G., and Guigo, R. (2005) Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?, *FEBS Letters* 579, 1900-1903.
44. Sazani, P., and Kole, R. (2003) Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing, *The Journal of Clinical Investigation* 112, 481-486.
45. Mercatante, D. R., Mohler, J. L., and Kole, R. (2002) Cellular Response to an Antisense-mediated Shift of Bcl-x Pre-mRNA Splicing and Antineoplastic Agents, *Journal of Biological Chemistry* 277, 49374-49382.
46. van Deutekom, J. C., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Frankhuizen, W. S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J. T., Koop, K., van der Kooij, A. J., Goemans, N. M., de Kimpe, S. J., Ekhart, P. F., Venneker, E. H., Platenburg, G. J., Verschuuren, J. J., and van Ommen, G.-J. B. (2007) Local Dystrophin Restoration with Antisense Oligonucleotide PRO051, *New England Journal of Medicine* 357, 2677-2686.
47. Heemskerk, H., De Winter, C. L., Van Ommen, G. J. B., Van Deutekom, J. C., and Aartsma-Rus, A. (2009) Development of Antisense-Mediated Exon Skipping as a Treatment for Duchenne Muscular Dystrophy, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1175, 71-79.
48. Takeshima, Y., Yagi, M., Wada, H., Ishibashi, K., Nishiyama, A., Kakumoto, M., Sakaeda, T., Saura, R., Okumura, K., and Matsuo, M. (2006) Intravenous Infusion of an Antisense Oligonucleotide Results in Exon Skipping in Muscle Dystrophin mRNA of Duchenne Muscular Dystrophy, *Pediatric Research* 59, 690-694
49. Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., Garralda, M. E., Rutherford, M., McCulley, C., Popplewell, L., Graham, I. R., Dickson, G., Wood, M. J. A., Wells, D. J., Wilton, S. D., Kole, R., Straub, V., Bushby, K., Sewry, C., Morgan, J. E., and Muntoni, F. (2009) Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study, *The Lancet Neurology* 8, 918-928.

50. Bauman John, J. N., Kole Ryszard. (2008) Therapeutic Potential of Splice-Switching Oligonucleotides, *OLIGONUCLEOTIDES XX*, 3-14.
51. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., and Farokhzad, O. C. (2008) Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics* 5, 505-515.
52. Denti, M. A., Rosa, A., D'Antona, G., Sthandier, O., De Angelis, F. G., Nicoletti, C., Allocca, M., Pansarasa, O., Parente, V., Musaro, A., Auricchio, A., Bottinelli, R., and Bozzoni, I. (2006) Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3758-3763.
53. Li, C. X., Parker, A., Menocal, E., Xiang, S., Borodyansky, L., and Fruehauf, J. H. (2006) Delivery of RNA interference, *Cell Cycle* 5, 2103-2109.
54. Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougères, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004) Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping, *Science* 306, 1796-1799.
55. Lorain, S., Gross, D.-A., Goyenvalle, A., Danos, O., Davoust, J., and Garcia, L. (2008) Transient Immunomodulation Allows Repeated Injections of AAV1 and Correction of Muscular Dystrophy in Multiple Muscles, *Mol Ther* 16, 541-547.
56. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003) LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1, *Science* 302, 415-419.
57. Park, F. (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis?, *Physiol. Genomics* 31, 159-173.
58. Woods, N.-B., A., O., and S., K. (2002) Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors, *Leukemia* 16, 563-569.
59. Wanisch, K., and Yanez-Munoz, R. J. (2009) Integration-deficient Lentiviral Vectors: A Slow Coming of Age, *Mol Ther* 17, 1316-1332.
60. Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., and McCormick, F. (1996) An Adenovirus Mutant That Replicates Selectively in p53- Deficient Human Tumor Cells, *Science* 274, 373-376.

61. Rein, D. T., Breidenbach, M., and Curiel, D. T. (2006) Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy, *Future Oncology* 2, 137-143.
62. Wickham, T. (2000) Targeting adenovirus, *Gene therapy* 7, 110-114.
63. Nouredдини, S. C., and Curiel, D. T. (2005) Genetic Targeting Strategies for Adenovirus, *Molecular Pharmaceutics* 2, 341-347.
64. Zaiss, A. K., Machado, H. B., and Herschman, H. R. (2009) The influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy, *Journal of Cellular Biochemistry* 108, 778-790.
65. Surosky, R., Urabe, M., Godwin, S., McQuiston, S., Kurtzman, G., Ozawa, K., and Natsoulis, G. (1997) Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome, *J. Virol.* 71, 7951-7959.
66. Hughes, V. (2007) Therapy on trial, *Nat Med* 13, 1008-1009.
67. Burton, E. A., Fink, D. J., and Glorioso, J. C. (2004) Gene Delivery Using Herpes Simplex Virus Vectors, *DNA and Cell Biology* 21, 915-936.
68. Gomez, C. E., Najera, J. L., Krupa, M., and Esteban, M. (2008) The Poxvirus Vectors MVA and NYVAC as Gene Delivery Systems for Vaccination Against Infectious Diseases and Cancer, *Current gene therapy* 8, 97-120.
69. Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy, *Nat Rev Genet* 4, 346-358.
70. Marshall, E. (1999) CLINICAL TRIALS:Gene Therapy Death Prompts Review of Adenovirus Vector, *Science* 286, 2244-2245.
71. Bostanci, A. (2002) GENE THERAPY: Blood Test Flags Agent in Death of Penn Subject, *Science* 295, 604b-605.
72. Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Ruhl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J. r., Toudjarska, I., Wheat, A. J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliansky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H.-P., and MacLachlan, I. (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates, *Nature* 441, 111-114.
73. Loney, C., Vandenbranden, M., and Ruyschaert, J.-M. (2008) Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling, *Progress in Lipid Research* 47, 340-347.
74. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into

- cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7297-7301.
75. Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A.-M., and Remy, J.-S. (1998) Chitosan-Based Vector/DNA Complexes for Gene Delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability, *Pharmaceutical Research* 15, 1332-1339.
  76. Eshita, Y., Higashihara, J., Onishi, M., Mizuno, M., Yoshida, J., Takasaki, T., Kubota, N., and Onishi, Y. (2009) Mechanism of Introduction of Exogenous Genes into Cultured Cells Using DEAE-Dextran-MMA Graft Copolymer as Non-Viral Gene Carrier, *Molecules* 14, 2669-2683.
  77. Wu, G. Y., and Wu, C. H. (1987) Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system, *Journal of Biological Chemistry* 262, 4429-4432.
  78. Kopatz, I., Remy, J.-S., and Behr, J.-P. (2004) A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin, *The Journal of Gene Medicine* 6, 769-776.
  79. Behr, J.-P. (1997) The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit, *CHIMIA International Journal for Chemistry* 51, 34-36.
  80. Behlke, M. A. (2006) Progress towards in Vivo Use of siRNAs, *Mol Ther* 13, 644-670.
  81. Schiffelers, R. M., Ansari, A., Xu, J., Zhou, Q., Tang, Q., Storm, G., Molema, G., Lu, P. Y., Scaria, P. V., and Woodle, M. C. (2004) Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle, *Nucleic Acids Research* 32, e149-e149.
  82. Liang, B., He, M.-L., Chan, C.-y., Chen, Y.-c., Li, X.-P., Li, Y., Zheng, D., Lin, M. C., Kung, H.-F., Shuai, X.-T., and Peng, Y. (2009) The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat, *Biomaterials* 30, 4014-4020.
  83. Creusat, G., and Zuber, G. (2008) Self-Assembling Polyethylenimine Derivatives Mediate Efficient siRNA Delivery in Mammalian Cells, *ChemBioChem* 9, 2787-2789.
  84. Creusat, G. (2008) Conception et évaluation de vecteurs synthétiques pour la transfection de siRNA à des fins thérapeutiques, In *Académie de Strasbourg*, Université de Strasbourg, Strasbourg.
  85. Dufès, C., Uchegbu, I. F., and Schätzlein, A. G. (2005) Dendrimers in gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 2177-2202.

86. Morris, M. C., Chaloin, L., Méry, J., Heitz, F., and Divita, G. (1999) A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier, *Nucleic Acids Research* 27, 3510-3517.
87. Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells, *Nucleic Acids Research* 25, 2730-2736.
88. Laufer, S. D., Recke, A. L., Veldhoen, S., Trampe, A., and Restle, T. (2009) Noncovalent Peptide-Mediated Delivery of Chemically Modified Steric Block Oligonucleotides Promotes Splice Correction: Quantitative Analysis of Uptake and Biological Effect, *Oligonucleotides* 19, 63-80.
89. Simeoni, F., Morris, M. C., Heitz, F., and Divita, G. (2003) Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells, *Nucleic Acids Research* 31, 2717-2724.
90. Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K.-E., Hee Kim, M., Davidson, B. L., Kyung Lee, S., Shankar, P., and Manjunath, N. (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system, *Nature* 448, 39-43.
91. Kim, W. J., Christensen, L. V., Jo, S., Yockman, J. W., Jeong, J. H., Kim, Y.-H., and Kim, S. W. (2006) Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma, *Mol Ther* 14, 343-350.
92. Kang, H., DeLong, R., Fisher, M., and Juliano, R. (2005) Tat-Conjugated PAMAM Dendrimers as Delivery Agents for Antisense and siRNA Oligonucleotides, *Pharmaceutical Research* 22, 2099-2106.
93. Saw, P. E., Ko, Y. T., and Jon, S. (2010) Efficient Liposomal Nanocarrier-mediated Oligodeoxynucleotide Delivery Involving Dual Use of a Cell-Penetrating Peptide as a Packaging and Intracellular Delivery Agent, *Macromolecular Rapid Communications* 31, 1155-1162.
94. Trabulo, S., Resina, S., Simies, S., Lebleu, B., and Pedroso de Lima, M. C. (2010) A non-covalent strategy combining cationic lipids and CPPs to enhance the delivery of splice correcting oligonucleotides, *Journal of Controlled Release* 145, 149-158.
95. Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sutlu, T., Johansson, H., and Langel, U. (2007) Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides, *The FASEB Journal* 21, 2664-2671.
96. Mehier-Humbert, S., and Guy, R. H. (2005) Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 733-753.

97. Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells, *Nature* 327, 70-73.
98. Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., and McCabe, D. (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 9568-9572.
99. VILLEMEJANE, J., and Mir, L. M. (2009) Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications, *British Journal of Pharmacology* 157, 207-219.
100. Zhang, G., Gao, X., Song, Y. K., Vollmer, R., Stolz, D. B., Gasiorowski, J. Z., Dean, D. A., and Liu, D. (2004) Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery, *Gene Ther* 11, 675-682.
101. Lu, Q. L., Bou-Gharios, G., and Partridge, T. A. (2003) Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory, *Gene Ther* 10, 131-142.
102. Kurreck, J. (2003) Antisense technologies, *European Journal of Biochemistry* 270, 1628-1644.
103. Bell, N. M., and Micklefield, J. (2009) Chemical Modification of Oligonucleotides for Therapeutic, Bioanalytical and other Applications, *ChemBioChem* 10, 2691-2703.
104. Eckstein, F. (1966) Nucleoside Phosphorothioates, *Journal of the American Chemical Society* 88, 4292-4294.
105. Eckstein, F. (1970) Nucleoside phosphorothioates, *Journal of the American Chemical Society* 92, 4718-4723.
106. Shaw, D. R., Rustagi, P. K., Kandimalla, E. R., Manning, A. N., Jiang, Z., and Agrawal, S. (1997) Effects of synthetic oligonucleotides on human complement and coagulation, *Biochemical Pharmacology* 53, 1123-1132.
107. Levin, A. A. (1999) A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1489, 69-84.
108. Monteith, D. K., and Levin, A. A. (1999) Synthetic Oligonucleotides: The Development of Antisense Therapeutics, *Toxicologic Pathology* 27, 8-13.
109. Dean, N. M., and Bennett, C. F. (2003) Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer, *Oncogene* 22, 9087-9096.

110. Letsinger, R. L., and Mungall, W. S. (1970) Nucleotide chemistry. XVI. Phosphoramidate analogs of oligonucleotides, *The Journal of Organic Chemistry* 35, 3800-3803.
111. Letsinger, R. L., Singman, C. N., Histan, G., and Salunkhe, M. (1988) Cationic oligonucleotides, *Journal of the American Chemical Society* 110, 4470-4471.
112. Fathi, R., Huang, Q., Coppola, G., Delaney, W., Teasdale, R., Krieg, A. M., and Cook, A. F. (1994) Oligonucleotides with novel, cationic backbone substituents: aminoethylphosphonates, *Nucl. Acids Res.* 22, 5416-5424.
113. Fathi, R., Huang, Q., Syi, J. L., Delaney, W., and Cook, A. F. (1994) (Aminomethyl)phosphonate derivatives of oligonucleotides, *Bioconjugate Chemistry* 5, 47-57.
114. Miller, P. S., Dreon, N., Pulford, S. M., and McParland, K. B. (1980) Oligothymidylate analogues having stereoregular, alternating methylphosphonate/phosphodiester backbones. Synthesis and physical studies, *Journal of Biological Chemistry* 255, 9659-9665.
115. Thiviyathan, V., Vyazovkina, K. V., Gozansky, E. K., Bichenchova, E., Abramova, T. V., Luxon, B. A., Lebedev, A. V., and Gorenstein, D. G. (2001) Structure of Hybrid Backbone Methylphosphonate DNA Heteroduplexes: Effect of R and S Stereochemistry, *Biochemistry* 41, 827-838.
116. Endo, M., and Komiyama, M. (1996) Novel Phosphoramidite Monomer for the Site-Selective Incorporation of a Diastereochemically Pure Phosphoramidate to Oligonucleotide, *The Journal of Organic Chemistry* 61, 1994-2000.
117. Horn, T., Chaturvedi, S., Balasubramaniam, T. N., and Letsinger, R. L. (1996) Oligonucleotides with alternating anionic and cationic phosphoramidate linkages: Synthesis and hybridization of stereo-uniform isomers, *Tetrahedron Letters* 37, 743-746.
118. Laurent, A., Naval, M., Debart, F., Vasseur, J., and Rayner, B. (1999) Chiral and steric effects in the efficient binding of alpha-anomeric deoxyoligonucleoside N-alkylphosphoramidates to ssDNA and RNA, *Nucl. Acids Res.* 27, 4151-4159.
119. Heidenreich, O., Gryaznov, S., and Nerenberg, M. (1997) RNase H-Independent Antisense Activity of Oligonucleotide N3', P5' Phosphoramidates, *Nucleic Acids Research* 25, 776-780.
120. Faria, M., Spiller, D. G., Dubertret, C., Nelson, J. S., White, M. R. H., Scherman, D., Helene, C., and Giovannangeli, C. (2001) Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and in vivo, *Nat Biotech* 19, 40-44.

121. Dempcy, R. O., Almarsson, O., and Bruice, T. C. (1994) Design and synthesis of deoxynucleic guanidine: a polycation analogue of DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7864-7868.
122. Kojima, N., and Bruice, T. C. (1999) Replacement of the Phosphodiester Linkages of RNA with Guanidinium Linkages: The Solid-Phase Synthesis of Ribonucleic Guanidine, *Organic Letters* 2, 81-84.
123. Barawkar, D. A., and Bruice, T. C. (1998) Synthesis, biophysical properties, and nuclease resistance properties of mixed backbone oligodeoxynucleotides containing cationic internucleoside guanidinium linkages: Deoxynucleic guanidine/DNA chimeras, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11047-11052.
124. Barawkar, D. A., Kwok, Y., Bruice, T. W., and Bruice, T. C. (2000) Deoxynucleic Guanidine/Peptide Nucleic Acid Chimeras: Synthesis, Binding and Invasion Studies with DNA, *Journal of the American Chemical Society* 122, 5244-5250.
125. Dempcy, R. O., Browne, K. A., and Bruice, T. C. (1995) Synthesis of the Polycation Thymidyl DNG, Its Fidelity in Binding Polyanionic DNA/RNA, and the Stability and Nature of the Hybrid Complexes, *Journal of the American Chemical Society* 117, 6140-6141.
126. Szabo, I. E., and Bruice, T. C. (2004) DNG cytidine: synthesis and binding properties of octameric guanidinium-linked deoxycytidine oligomer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 4233-4244.
127. Linkletter, B. A., and Bruice, T. C. (1998) Solid-phase synthesis of oligomeric deoxynucleic guanidine (DNG): A polycationic analogue of DNA, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8, 1285-1290.
128. Kojima, N., Szabo, I. E., and Bruice, T. C. (2002) Synthesis of ribonucleic guanidine: replacement of the negative phosphodiester linkages of RNA with positive guanidinium linkages, *Tetrahedron* 58, 867-879.
129. Barawkar, D. A., and Bruice, T. C. (1999) Deoxynucleic Guanidines/PNA (DNG/PNA) Chimeras: Oligonucleoside Analogue Containing Cationic Guanidinium and Neutral Amide Linkages, *Journal of the American Chemical Society* 121, 10418-10419.
130. Park, M., and Bruice, T. C. (2010) Development of potential anticancer agents that target the telomere sequence, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 3982-3986.
131. Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., and Wengel, J. (1998) LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil

- bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition, *Tetrahedron* *54*, 3607-3630.
132. Braasch, D. A., and Corey, D. R. (2001) Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA, *8*, 1-7.
133. Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., and Erdmann, V. A. (2002) Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids, *Nucl. Acids Res.* *30*, 1911-1918.
134. Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G. J., Giese, K., and Kaufmann, J. (2003) Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells, *Nucleic Acids Research* *31*, 2705-2716.
135. Chiu, Y.-L., and Rana, T. M. (2003) siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis, *RNA* *9*, 1034-1048.
136. Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G. J., Giese, K., and Kaufmann, J. (2003) Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells, *Nucl. Acids Res.* *31*, 2705-2716.
137. Prakash, T. P., Allerson, C. R., Dande, P., Vickers, T. A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B. F., Swayze, E. E., Griffey, R. H., and Bhat, B. (2005) Positional Effect of Chemical Modifications on Short Interference RNA Activity in Mammalian Cells, *Journal of Medicinal Chemistry* *48*, 4247-4253.
138. Shukla, S., Sumaria, C., and Pradeepkumar, P. (2010) Exploring Chemical Modifications for siRNA Therapeutics: A Structural and Functional Outlook, *ChemMedChem* *5*, 328-349.
139. Frederick, J. R., Raul, D. S., Dirk, J. B., Marais, A. D., Min-Ji, C., William, C. C., Robin, H. L., Daniel, G., Ju, L. T., Scott, C.-T., Diane, L. T., JoAnn, D. F., and Stanley, T. C. (2010) Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *LANCET* *375*, 998-1006.
140. Alahari, S. K., DeLong, R., Fisher, M. H., Dean, N. M., Viliet, P., and Juliano, R. L. (1998) Novel Chemically Modified Oligonucleotides Provide Potent Inhibition of P-Glycoprotein Expression, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* *286*, 419-428.
141. Allerson, C. R., Sioufi, N., Jarres, R., Prakash, T. P., Naik, N., Berdeja, A., Wanders, L., Griffey, R. H., Swayze, E. E., and Bhat, B. (2005) Fully 2'-Modified Oligonucleotide Duplexes with Improved in Vitro Potency and Stability Compared to Unmodified Small Interfering RNA, *Journal of Medicinal Chemistry* *48*, 901-904.

142. Potier, P., Adib, A., Kochkine, A. Ø., Huc, I., and Behr, J.-P. (1999) Synthesis of Oligonucleotides Bearing Polyamine Groups for Recognition of DNA Sequences, *Nucleosides and Nucleotides 18*, 1467 - 1468.
143. Potier, P., Abdennaji, A., and Behr, J.-P. (2000) Synthesis and Hybridization Properties of Oligonucleotides Containing Polyamines at the C-2 Position of Purines: A Pre-synthetic Approach for the Incorporation of Spermine into Oligodeoxynucleotides Containing 2-(4,9,13-Triazatridecyl)-2prime-deoxyguanosine, *Chemistry - A European Journal 6*, 4188-4194.
144. Benimetskaya, L., Berton, M., Kolbanovsky, A., Benimetsky, S., and Stein, C. A. (1997) Formation of a G-tetrad and higher order structures correlates with biological activity of the RelA (NF- $\kappa$ B p65) 'antisense' oligodeoxynucleotide, *Nucl. Acids Res. 25*, 2648-2656.
145. Rao, T. S., Durland, R. H., Seth, D. M., Myrick, M. A., Bodepudi, V., and Revankar, G. R. (1995) Incorporation of 2'-Deoxy-6-thioguanosine into G-Rich Oligodeoxyribonucleotides Inhibits G-Tetrad Formation and Facilitates Triplex Formation, *Biochemistry 34*, 765-772.
146. Faruqi, A. F., Krawczyk, S. H., Matteucci, M. D., and Glazer, P. M. (1997) Potassium-Resistant Triple Helix Formation and Improved Intracellular Gene Targeting by Oligodeoxyribonucleotides Containing 7-Deazaxanthine, *Nucl. Acids Res. 25*, 633-640.
147. Summerton, J., and Weller, D. (1997) Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development 7*, 187-195.
148. Demidov, V. V., Potaman, V. N., Frank-Kamenetskii, M. D., Egholm, M., Buchardt, O., S<sup>^</sup>nichsen, S. r. H., and Nielsen, P. E. (1994) Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts, *Biochemical Pharmacology 48*, 1310-1313.
149. Hyrup, B., and Nielsen, P. E. (1996) Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, properties and potential applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry 4*, 5-23.
150. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B., and Nielsen, P. E. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature 365*, 566-568.
151. Ratilainen, T., Holmen, A., Tuite, E., Nielsen, P. E., and Norden, B. (2000) Thermodynamics of Sequence-Specific Binding of PNA to DNA, *Biochemistry 39*, 7781-7791.

152. Weiler, J., Gausepohl, H., Hauser, N., Jensen, O. N., and Hoheisel, J. D. (1997) Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays, *Nucl. Acids Res.* 25, 2792-2799.
153. Sazani, P., Kang, S.-H., Maier, M. A., Wei, C., Dillman, J., Summerton, J., Manoharan, M., and Kole, R. (2001) Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs, *Nucl. Acids Res.* 29, 3965-3974.
154. Sazani, P., Gemignani, F., Kang, S.-H., Maier, M. A., Manoharan, M., Persmark, M., Bortner, D., and Kole, R. (2002) Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues, *Nat Biotech* 20, 1228-1233.
155. Ivanova, G. D., Arzumanov, A., Abes, R., Yin, H., Wood, M. J. A., Lebleu, B., and Gait, M. J. (2008) Improved cell-penetrating peptide-PNA conjugates for splicing redirection in HeLa cells and exon skipping in mdx mouse muscle, *Nucl. Acids Res.* 36, 6418-6428.
156. Krieg, A. M., Tonkinson, J., Matson, S., Zhao, Q., Saxon, M., Zhang, L. M., Bhanja, U., Yakubov, L., and Stein, C. A. (1993) Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' cholesteryl moiety increases cellular association and improves efficacy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1048-1052.
157. Stein, C. A., Pal, R., DeVico, A. L., Hoke, G., Mumbauer, S., Kinstler, O., Sarngadharan, M. G., and Letsinger, R. L. (1991) Mode of action of 5'-linked cholesteryl phosphorothioate oligodeoxynucleotides in inhibiting syncytia formation and infection by HIV-1 and HIV-2 in vitro, *Biochemistry* 30, 2439-2444.
158. Letsinger, R. L., Zhang, G. R., Sun, D. K., Ikeuchi, T., and Sarin, P. S. (1989) Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6553-6556.
159. Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs', *Nature* 438, 685-689.
160. Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Koteliansky, V., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2007) Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs, *Nat Biotech* 25, 1149-1157.
161. Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.-P., and Unverzagt, C. (2004) Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 4975-4977.

162. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M., and Vornlocher, H.-P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs, *Nature* 432, 173-178.
163. Cheng, K., Ye, Z., Guntaka, R. V., and Mahato, R. I. (2006) Enhanced Hepatic Uptake and Bioactivity of Type  $\alpha\pm 1(I)$  Collagen Gene Promoter-Specific Triplex-Forming Oligonucleotides after Conjugation with Cholesterol, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317, 797-805.
164. Gissot, A., Camplo, M., Grinstaff, M. W., and Barthelemy, P. (2008) Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: a successful marriage of nucleic acids with lipids, *Organic & Biomolecular Chemistry* 6, 1324-1333.
165. Bijsterbosch, M. K., Rump, E. T., Vrueth, R. L. A. D., Dorland, R., van Veghel, R., Tivel, K. L., Biessen, E. A. L., van Berkel, T. J. C., and Manoharan, M. (2000) Modulation of plasma protein binding and in vivo liver cell uptake of phosphorothioate oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation, *Nucl. Acids Res.* 28, 2717-2725.
166. Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology* 3, 97-130.
167. Doores, K. J., Gamblin, D. P., and Davis, B. G. (2006) Exploring and Exploiting the Therapeutic Potential of Glycoconjugates, *Chemistry – A European Journal* 12, 656-665.
168. Adinolfi, M., De Napoli, L., Di Fabio, G., Iadonisi, A., Montesarchio, D., and Piccialli, G. (2002) Solid phase synthesis of oligonucleotides tethered to oligo-glucose phosphate tails, *Tetrahedron* 58, 6697-6704.
169. Zatsopin, T., and Oretskaya, T. (2004) Synthesis and Applications of Oligonucleotide-Carbohydrate Conjugates, *Chemistry & Biodiversity* 1, 1401-1417.
170. D'Onofrio, J., Petraccone, L., Martino, L., Fabio, G. D., Iadonisi, A., Balzarini, J., Giancola, C., and Montesarchio, D. (2008) Synthesis, Biophysical Characterization, and Anti-HIV Activity of Glyco-Conjugated G-Quadruplex-Forming Oligonucleotides, *Bioconjugate Chemistry* 19, 607-616.
171. Hangeland, J. J., Levis, J. T., Lee, Y. C., and Tso, P. O. P. (1995) Cell-Type Specific and Ligand Specific Enhancement of Cellular Uptake of Oligodeoxynucleoside Methylphosphonates Covalently Linked with a Neoglycopeptide, YEE(ah-GalNAc)<sub>3</sub>, *Bioconjugate Chemistry* 6, 695-701.

172. Biessen, E. A. L., Vietsch, H., Rump, E. T., Fluiter, K., Busterbosch, M. K., and van Berkel, T. J. C. (2000) [23] Targeted delivery of antisense oligonucleotides to parenchymal liver cells in vivo, In *Methods in Enzymology* (Phillips, M. I., Ed.), pp 324-342, Academic Press.
173. Duff, R. J., Deamond, S. F., Roby, C., Zhou, Y., and Ts'o, P. O. P. (2000) Intrabody tissue-specific delivery of antisense conjugates in animals: Ligand-linker-antisense oligomer conjugates, In *Methods in Enzymology* (Phillips, M. I., Ed.), pp 297-321, Academic Press.
174. Zhang, J., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S., Praly, J.-P., Souteyrand, E., Vasseur, J.-J., Morvan, F., and Chevlot, Y. (2009) Specific recognition of lectins by oligonucleotide glycoconjugates and sorting on a DNA microarray, *Chemical Communications*, 6795-6797.
175. Chevlot, Y., Bouillon, C., Vidal, S., Morvan, F., Meyer, A., Cloarec, J. P., Jochum, A., Praly, J. P., Vasseur, J. J., and Souteyrand, E. (2007) DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering, *Angewandte Chemie International Edition* 46, 2398-2402.
176. Morvan, F., Meyer, A., Jochum, A., Sabin, C., Chevlot, Y., Imberty, A., Praly, J.-P., Vasseur, J.-J., Souteyrand, E., and Vidal, S. (2007) Fucosylated Pentaerythrityl Phosphodiester Oligomers (PePOs): Automated Synthesis of DNA-Based Glycoclusters and Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin (PA-IIL), *Bioconjugate Chemistry* 18, 1637-1643.
177. Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J.-J., and Morvan, F. (2009) Synthesis of Mannose and Galactose Oligonucleotide Conjugates by Bi-click chemistry, *The Journal of Organic Chemistry* 74, 1218-1222.
178. Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J.-J., and Morvan, F. (2008) Combinatorial and Automated Synthesis of Phosphodiester Galactosyl Cluster on Solid Support by Click Chemistry Assisted by Microwaves, *The Journal of Organic Chemistry* 73, 6014-6017.
179. Pourceau, G., Meyer, A., Chevlot, Y., Souteyrand, E., Vasseur, J.-J., and Morvan, F. (2010) Oligonucleotide Carbohydrate-Centered Galactosyl Cluster Conjugates Synthesized by Click and Phosphoramidite Chemistries, *Bioconjugate Chemistry* 21, 1520-1529.
180. Imberty, A., Wimmerová, M., Mitchell, E. P., and Gilboa-Garber, N. (2004) Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition, *Microbes and Infection* 6, 221-228.
181. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *Journal of Biological Chemistry* 269, 10444-10450.

182. Frankel, A. D., and Pabo, C. O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell* 55, 1189-1193.
183. Vivès, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997) A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus, *Journal of Biological Chemistry* 272, 16010-16017.
184. Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Shaw, B. R., and Juliano, R. L. (2002) Conjugates of Antisense Oligonucleotides with the Tat and Antennapedia Cell-Penetrating Peptides: Effects on Cellular Uptake, Binding to Target Sequences, and Biologic Actions, *Pharmaceutical Research* 19, 744-754.
185. Pooga, M., Soomets, U., Hallbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J.-X., Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T., Bartfai, T., and Langel, U. (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo, *Nat Biotech* 16, 857-861.
186. Wender, P. A., Galliher, W. C., Goun, E. A., Jones, L. R., and Pillow, T. H. (2008) The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 452-472.
187. Hansen, M., Kilk, K., and Langel, I. (2008) Predicting cell-penetrating peptides, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 572-579.
188. Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating Peptides, *Journal of Biological Chemistry* 278, 585-590.
189. Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R. (2007) A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides, *Traffic* 8, 848-866.
190. Abes, S., Turner, J. J., Ivanova, G. D., Owen, D., Williams, D., Arzumanov, A., Clair, P., Gait, M. J., and Lebleu, B. (2007) Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide, *Nucleic Acids Research* 35, 4495-4502.
191. Abes, S., Moulton, H., Turner, J., Clair, P., Richard, J. P., Iversen, P., Gait, M. J., and Lebleu, B. (2007) Peptide-based delivery of nucleic acids: design, mechanism of uptake and applications to splice-correcting oligonucleotides, *Biochemical Society Transactions* 35, 53-55.
192. Abes, S., Moulton, H. M., Clair, P., Prevot, P., Youngblood, D. S., Wu, R. P., Iversen, P. L., and Lebleu, B. (2006) Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)<sub>4</sub> peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents, *Journal of Controlled Release* 116, 304-313.

193. Moschos, S. A., Jones, S. W., Perry, M. M., Williams, A. E., Erjefalt, J. S., Turner, J. J., Barnes, P. J., Sproat, B. S., Gait, M. J., and Lindsay, M. A. (2007) Lung Delivery Studies Using siRNA Conjugated to TAT(48,àí60) and Penetratin Reveal Peptide Induced Reduction in Gene Expression and Induction of Innate Immunity, *Bioconjugate Chemistry* 18, 1450-1459.
194. Turner, J. J., Jones, S., Fabani, M. M., Ivanova, G., Arzumanov, A. A., and Gait, M. J. RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 38, 1-7.
195. Laufer, S. D., and Restle, T. (2008) Peptide-Mediated Cellular Delivery of Oligonucleotide-Based Therapeutics In Vitro: Quantitative Evaluation of Overall Efficacy Employing Easy to Handle Reporter Systems, *Current Pharmaceutical Design* 14, 3637-3655.
196. Davidson, T. J., Harel, S., Arboleda, V. A., Prunell, G. F., Shelanski, M. L., Greene, L. A., and Troy, C. M. (2004) Highly Efficient Small Interfering RNA Delivery to Primary Mammalian Neurons Induces MicroRNA-Like Effects before mRNA Degradation, *J. Neurosci.* 24, 10040-10046.
197. Abes, S., Williams, D., Prevot, P., Thierry, A., Gait, M. J., and Lebleu, B. (2006) Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates, *Journal of Controlled Release* 110, 595-604.
198. Said Hassane, F., Saleh, A., Abes, R., Gait, M., and Lebleu, B. (2010) Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides, *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 715-726.
199. Braunlin, W. H., Strick, T. J., and Record, M. T. (1982) Equilibrium dialysis studies of polyamine binding to DNA, *Biopolymers* 21, 1301-1314.
200. Schmid, N., and Behr, J. P. (1991) Location of spermine and other polyamines on DNA as revealed by photoaffinity cleavage with poly(amino)benzenediazonium salts, *Biochemistry* 30, 4357-4361.
201. Wemmer, D. E., Srivenugopal, K. S., Reid, B. R., and Morris, D. R. (1985) Nuclear magnetic resonance studies of polyamine binding to a defined DNA sequence, *Journal of Molecular Biology* 185, 457-459.
202. Moreau, V., Voirin, E., Paris, C., Kotera, M., Nothisen, M., Remy, J.-S., Behr, J.-P., Erbacher, P., and Lenne-Samuel, N. (2009) Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription, *Nucl. Acids Res.* 37, e130-.
203. Nothisen, M., Kotera, M., Voirin, E., Remy, J.-S., and Behr, J.-P. (2009) Cationic siRNAs Provide Carrier-Free Gene Silencing in Animal Cells, *Journal of the American Chemical Society* 131, 17730-17731.

204. Voirin, E., Behr, J.-P., and Kotera, M. (2007) Versatile synthesis of oligodeoxyribonucleotide-oligospermine conjugates, *Nat. Protocols* 2, 1360-1367.
205. Perreault, D. M., Cabell, L. A., and Anslyn, E. V. (1997) Using guanidinium groups for the recognition of RNA and as catalysts for the hydrolysis of RNA, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5, 1209-1220.
206. Orner, B. P., and Hamilton, A. D. (2001) The Guanidinium Group in Molecular Recognition: Design and Synthetic Approaches, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 41, 141-147.
207. Manimala, J., and Anslyn, E. (2002) Solid-Phase Synthesis of Guanidinium Derivatives from Thiourea and Isothiourea Functionalities, *European Journal of Organic Chemistry* 2002, 3909-3922.
208. Schneider, S. E., Bishop, P. A., Salazar, M. A., Bishop, O. A., and Anslyn, E. V. (1998) Solid phase synthesis of oligomeric guanidiniums, *Tetrahedron* 54, 15063-15086.
209. Zhang, Z., and Fan, E. (2005) Solid-Phase and Solution-Phase Syntheses of Oligomeric Guanidines Bearing Peptide Side Chains, *The Journal of Organic Chemistry* 70, 8801-8810.
210. Zhang, Z., Pickens, J. C., Hol, W. G. J., and Fan, E. (2004) Solution- and Solid-Phase Syntheses of Guanidine-Bridged, Water-Soluble Linkers for Multivalent Ligand Design, *Organic Letters* 6, 1377-1380.
211. Zhang, Z., Carter, T., and Fan, E. (2003) Oligomeric guanidine synthesis assisted by TFA-sensitive arylsulfonylthiourea, *Tetrahedron Letters* 44, 3063-3066.
212. Jain, M. L., and Bruice, T. C. (2006) Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanidine (DNG) oligonucleotide incorporating 7-deazaguanine bases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 7333-7346.
213. Pak, J. K., and Hesse, M. (1998) Regioselective Deprotection and Acylation of Penta-*N*-Protected Thermopentamine, *Helvetica Chimica Acta* 81, 2300-2313.
214. Lang, H., Gottlieb, M., Schwarz, M., Farkas, S., Schulz, B. S., Himmelsbach, F., Charubala, R., and Pfleiderer, W. (1999) Nucleotides, Part LXIII, New 2-(4-Nitrophenyl)ethyl(Npe)- and 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl(Npeoc)-Protected 2prime-Deoxyribonucleosides and Their 3prime-Phosphoramidites - Versatile Building Blocks for Oligonucleotide Synthesis, *Helvetica Chimica Acta* 82, 2172-2185.
215. Martin, N. I., Woodward, J. J., and Marletta, M. A. (2006) NG-Hydroxyguanidines from Primary Amines, *Organic Letters* 8, 4035-4038.

216. Martin, N. I., Beeson, W. T., Woodward, J. J., and Marletta, M. A. (2008) NG-Aminoguanidines from Primary Amines and the Preparation of Nitric Oxide Synthase Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 924-931.
217. Exposito, A., Fernandez-Suarez, M., Iglesias, T., Munoz, L., and Riguera, R. (2001) Total Synthesis and Absolute Configuration of Minalemine A, a Guanidine Peptide from the Marine Tunicate *Didemnum rodriguezii*, *The Journal of Organic Chemistry* 66, 4206-4213.
218. Yong, Y. F., Kowalski, J. A., and Lipton, M. A. (1997) Facile and Efficient Guanylation of Amines Using Thioureas and Mukaiyama's Reagent, *The Journal of Organic Chemistry* 62, 1540-1542.
219. Linton, B. R., Carr, A. J., Orner, B. P., and Hamilton, A. D. (2000) A Versatile One-Pot Synthesis of 1,3-Substituted Guanidines from Carbamoyl Isothiocyanates, *The Journal of Organic Chemistry* 65, 1566-1568.
220. Martin, N. I., and Liskamp, R. M. J. (2008) Preparation of NG-Substituted l-Arginine Analogues Suitable for Solid Phase Peptide Synthesis, *The Journal of Organic Chemistry* 73, 7849-7851.
221. Tamaki, M., Han, G., and Hruby, V. J. (2001) Practical and Efficient Synthesis of Orthogonally Protected Constrained 4-Guanidinoprolines, *The Journal of Organic Chemistry* 66, 1038-1042.
222. Li, J., Kou, J., Luo, X., and Fan, E. (2008) A facile synthesis of 2-(N-alkylamino)-pyrimidin-4-one derivatives, *Tetrahedron Letters* 49, 2761-2763.
223. Li, J., Zhang, G., Zhang, Z., and Fan, E. (2003) TFA-Sensitive Arylsulfonylthiourea-Assisted Synthesis of N,N'-Substituted Guanidines, *The Journal of Organic Chemistry* 68, 1611-1614.
224. Elisenda Ferrer, G. N., Matthias Mann, Ramon Eritja. (1997) Synthesis of oligodeoxynucleotides containing 5-aminouracil and its N-acetyl derivative, *Journal of chemical society, Perkin Transaction 1*, 2051-2057.
225. Gude, M., Ryf, J., and White, P. D. (2002) An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase supports, *Letters in Peptide Science* 9, 203-206.
226. Pons, B., Kotera, M., Zuber, G., and Behr, J.-P. (2006) Online Synthesis of Diblock Cationic Oligonucleotides for Enhanced Hybridization to their Complementary Sequence, *ChemBioChem* 7, 1173-1176.
227. Noir, R., Kotera, M., Pons, B., Remy, J.-S., and Behr, J.-P. (2008) Oligonucleotide-Oligospermine Conjugates (Zip Nucleic Acids): A Convenient Means of Finely Tuning Hybridization Temperatures, *Journal of the American Chemical Society* 130, 13500-13505.

228. Shinada, T., Umezawa, T., Ando, T., Kozuma, H., and Ohfune, Y. (2006) A new entry for the synthesis of N-acyl-N'-substituted guanidines, *Tetrahedron Letters* 47, 1945-1947.
229. Feichtinger, K., Zapf, C., Sings, H. L., and Goodman, M. (1998) Diprotected Triflylguanidines: A New Class of Guanidinylation Reagents, *The Journal of Organic Chemistry* 63, 3804-3805.
230. Capaldi, D. C., Gaus, H., Krotz, A. H., Arnold, J., Carty, R. L., Moore, M. N., Scozzari, A. N., Lowery, K., Cole, D. L., and Ravikumar, V. T. (2003) Synthesis of High-Quality Antisense Drugs. Addition of Acrylonitrile to Phosphorothioate Oligonucleotides: Adduct Characterization and Avoidance, *Organic Process Research & Development* 7, 832-838.
231. Frank, R. (2007) Segmented Solid Supports: Personal Addiction to Merrifieldprimes Solid-Phase Synthesis, *ChemInform* 38.
232. Avino, A., Garcia, R. G. i., Albericio, F., Mann, M., Wilm, M., Neubauer, G., and Eritja, R. (1996) New carbamate supports for the preparation of 3'-amino-modified oligonucleotides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4, 1649-1658.
233. Brown, T., Pritchard, C. E., Turner, G., and Salisbury, S. A. (1989) A New Base-stable Linker for Solid-phase Oligonucleotide Synthesis, *Journal of the chemical society, chemical communications*, 891-893.
234. Stengele, K.-P., and Pflaiderer, W. (1990) Improved synthesis of oligodeoxyribonucleotides, *Tetrahedron Letters* 31, 2549-2552.
235. Hudson, R. H. E., and Damha, M. J. (1993) Nucleic acid dendrimers: novel biopolymer structures, *Journal of the American Chemical Society* 115, 2119-2124.
236. Hamza, D. (2001) Fmoc analysis of solid-supported amine, *Synthetic pages*, 121.
237. Barawkar, D. A., Linkletter, B., and Bruice, T. C. (1998) Synthesis of protected guanidinium linked dinucleoside incorporable into an oligonucleotide using solid phase DNA methodology, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8, 1517-1520.
238. Karigiannis, G., and Papaioannou, D. (2000) Structure, Biological Activity and Synthesis of Polyamine Analogues and Conjugates, *European Journal of Organic Chemistry* 2000, 1841-1863.
239. Kang, S.-H., Cho, M.-J., and Kole, R. (1998) Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development, *Biochemistry* 37, 6235-6239.
240. Lu, Q. L., Rabinowitz, A., Chen, Y. C., Yokota, T., Yin, H., Alter, J., Jadoon, A., Bou-Gharios, G., and Partridge, T. (2005) Systemic delivery of antisense

- oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 198-203.
241. McClorey, G., Moulton, H. M., Iversen, P. L., Fletcher, S., and Wilton, S. D. (2006) Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD, *Gene Ther* 13, 1373-1381.
242. Kang, S.-H., Cho, M.-J., and Kole, R. (1998) Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development, *Biochemistry* 37, 6235-6239.
243. Resina, S., Kole, R., Travo, A., Lebleu, B., and Thierry, A. R. (2007) Switching on transgene expression by correcting aberrant splicing using multi-targeting steric-blocking oligonucleotides, *The Journal of Gene Medicine* 9, 498-510.
244. Akhtar, S., and Benter, I. F. (2007) Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo, *The Journal of Clinical Investigation* 117, 3623-3632.
245. Ma, Z., Li, J., He, F., Wilson, A., Pitt, B., and Li, S. (2005) Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330, 755-759.
246. Meade, B. R. (2009) The Road to Therapeutic RNA Interference (RNAi): Tackling the 800 Pound siRNA Delivery Gorilla *Discovery medicine* 43, 253-256.
247. Muratovska, A., and Eccles, M. R. (2004) Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells, *FEBS Letters* 558, 63-68.
248. Eguchi, A., and Dowdy, S. F. (2009) siRNA delivery using peptide transduction domains, *Trends in Pharmacological Sciences* 30, 341-345.
249. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. (2002) Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi, *Cell* 110, 563-574.
250. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate, *EMBO J* 20, 6877-6888.
251. Gosse, C., Boutorine, A., Aujard, I., Chami, M., Kononov, A., Cogné-Laage, E., Allemand, J. F., Li, J., and Jullien, L. (2004) Micelles of Lipid-Oligonucleotide Conjugates: Implications for Membrane Anchoring and Base Pairing, *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 6485-6497.

252. Teixeira Jr, F., Rigler, P., and Vebert-Nardin, C. (2007) Nucleo-copolymers: oligonucleotide-based amphiphilic diblock copolymers, *Chemical Communications*, 1130-1132.
253. Dentinger, P. M., Simmons, B. A., Cruz, E., and Sprague, M. (2006) DNA-Mediated Delivery of Lipophilic Molecules via Hybridization to DNA-Based Vesicular Aggregates, *Langmuir* 22, 2935-2937.
254. Svintradze, D. V., and Mrevlishvili, G. M. (2005) Fiber molecular model of atelocollagen-small interfering RNA (siRNA) complex, *International Journal of Biological Macromolecules* 37, 283-286.
255. Brown, T., and Brown, D. J. S. (1991) Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, In *Oligonucleotides and Their Analogues, A practical approach*, p 20, Eckstein F.
256. Agrawal, S. (1993) *Protocols for oligonucleotides and analogs. Synthesis and properties*, Vol. 20, Humana Press Inc. .



# Communications et publication



**Communications orales :**

- Journées Campus d'Illkirch (mai 2010) :

*Oligonucléotides cationiques : molécules auto-transfectantes.*

Perche P., Nothisen M., Noir R., Behr J.P., Kotera M., Remy J.S.

- Congrès RECOB13 (mars 2010) :

*Oligonucléotides cationiques : molécules auto-transfectantes.*

Perche P., Kotera M., Remy J.S.

- Journée des doctorants en chimie (novembre 2009) :

*Oligonucléotides cationiques : système de d'autodélivrance cellulaire à l'échelle moléculaire.*

Perche P., Kotera M., Remy J.S.

**Publications :**

- Congrès GTRV Angers (Poster, décembre 2008) :

*Oligonucleotide-polyamine conjugates : a new synthesis for nucleic acid delivery*

Perche P., Noir R., Nothisen M., Pons B., Behr J.P., Kotera M., Remy J.S.









## Résumé

Ce travail porte sur la synthèse et l'évaluation d'oligonucléotides conjugués à des polyamines. Dans un premier temps, une polyamine naturelle, la spermine a été couplée répétitivement à l'extrémité 3' d'un oligonucléotide grâce à une nouvelle stratégie de conjugaison : la formation d'une liaison guanidine inter-spermines. Jusqu'à 3 résidus polyaminés ont ainsi été ajoutés à un décamère. Ces conjugués présentent une affinité améliorée pour des oligonucléotides de séquences complémentaires. Toutefois, leur synthèse demande à être perfectionnée pour obtenir des composés de charge globale cationique. Dans un deuxième temps, des oligonucléotides antisens présentant un squelette modifié 2'-OMe phosphorothioate ont été couplés en 5' à des spermines par la chimie des phosphoramidites. Ces oligonucléotides, cationiques, ont montré une internalisation cellulaire **sans agent de transfection** et une efficacité biologique sur un modèle *in vitro* de correction de l'épissage alternatif. Enfin, des siRNAs cationiques ont été synthétisés et conjugués à des résidus lipidiques. Ces parties lipophiles servent « d'ancres » pour pré-associer les siRNAs avec une protéine sérique, l'albumine, afin de les protéger *in vivo* de la dégradation par les nucléases. Leur capacité à se présenter sous forme de molécules isolées ou à s'auto-assembler, et leur interaction avec l'albumine ont été caractérisées par microscopie électronique en transmission. Ces siRNAs sont capables d'éteindre l'expression d'un gène (*ca* 90%) *in vitro* **sans agent de transfection**, y compris **en présence de sérum**. Leur pré-association avec l'albumine n'affecte en rien leur efficacité.

**Mots-clefs :** Oligonucléotides conjugués ; spermine ; guanidine ; internalisation cellulaire ; correction de l'épissage alternatif ; siRNAs ; conjugaison de lipides ; résistance au sérum.

---

## Summary

This work consists in synthesis and evaluation of oligonucleotides-polyamines conjugates. First, a natural polyamine, the spermine, was repetitively coupled to the 3'-end of an oligonucleotide through novel conjugation chemistry, resulting in the formation of a guanidine inter-spermine link. Up to three spermine residues could thus be appended to a decamer. Such conjugates exhibited increased affinity for their target sequence. However, synthetic improvements are required in order to obtain oligonucleotides with an overall cationic charge. Subsequently, antisense oligonucleotides bearing a 2'-OMe phosphorothioate modified backbones were coupled to polyspermines at their 5' end, through phosphoramidite chemistry. Those cationic oligonucleotides showed carrier-free cell transfection potency and efficient splicing correction in an *in vitro* model. Finally, cationic siRNAs were synthesized and conjugated to lipidic moieties. Lipophilic blocks would serve as "anchors" to pre-load those siRNAs on seric protein albumin, to protect them *in vivo* from nuclease degradation. Ability of such conjugates to exist at a single molecule state or to self-assemble as well as their interaction with albumin were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM). Lipophilic siRNAs were able to induce gene silencing (*ca* 90%) without the use of any transfection agent, even in presence of serum. Preloading them on albumin did not impair their biological efficiency.

**Keywords:** Oligonucleotide conjugates; spermine; guanidine; cell transfection; splice site correction; siRNAs; lipid conjugation; serum resistance.