

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7199

THÈSE

présentée par

Clément PARIS

soutenue le : **10 janvier 2013**

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Sciences Chimiques

**Développement d'oligonucléotides
cationiques pour l'hybridation moléculaire
et la thérapie.**

THÈSE dirigée par :

M. REMY Jean-Serge

Dr, Université de Strasbourg

M. ERBACHER Patrick

Dr, Polyplus-Transfection

RAPPORTEURS :

M. MALVY Claude

Pr, Université Paris XI

M. VASSEUR Jean-Jacques

Dr, Université de Montpellier II

MEMBRES DU JURY :

Mme. SCHREIBER Valérie

Dr, Université de Strasbourg

M. MERLIN Jean-Louis

Pr, Université de Lorraine

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de la société Polyplus-Transfection et du Laboratoire de Chimie Génétique, sous la direction des Docteurs Patrick Erbacher et Jean-Serge Remy. Je les remercie de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes, et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse.

Je remercie le Professeur Claude Malvy, le Docteur Jean-Jacques Vasseur, le Docteur Jean-Louis Merlin et le Docteur Valérie Schreiber, de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie mes collègues qui ont travaillé avec moi à Polyplus sur ce projet : Nathalie Lenne, Valérie Moreau, Gaëlle Deglane, Bernard Couturier, Valérie Kedinge, Anne-Laure Bolcato Bellemin et Aline Meule.

Je remercie les personnes du Laboratoire de Chimie Génétique : le Docteur Mitsuharu Kotera, le Docteur Jean-Paul Behr, le Docteur Emmanuelle Morin-Picardat et David Sigwaldt.

Je remercie également toute l'équipe de Polyplus pour leur bonne humeur : Andréa, Alain, Anne-Lise, Anne-Solen, Cindy, Chrystel, Claire, Fabrice, Frédéric, Gabriel, Habib, Géraldine, Jean, Jean-Baptiste, Isabelle, Jeanne, Julien, John, Léone, Loukmane, Marie-Elise, Mark, Mathieu, Omar, Pascale, Patrick N, Romuald et Virginie.

Je remercie le Docteur Jean-Marc Strub pour les analyses de spectrométrie de masse Esi-Tof, ainsi que Franck Ruffenach et le Docteur Adeline Page pour leurs précieux conseils en spectrométrie de masse MALDI-ToF.

Je remercie le Docteur Mounir Maaloum pour les analyses faites par microscopie à force atomique ainsi que Christine Ruhlmann pour ses conseils en microscopie électronique en transmission.

Introduction générale.	13
Chapitre 1 : Les acides nucleiques en biologie moleculaire.	17
A. Utilisation.....	17
1. Généralités.....	17
2. Hybridation in situ fluorescente: FISH.....	17
3. Southern blot et Northern blot.	18
4. Puce à ADN.	19
5. La réaction en chaîne par polymérase : PCR.....	20
a) La PCR quantitative.	22
b) La PCR en temps réel ou « Real Time PCR ».....	22
B. Structure.	24
1. Généralités.....	24
2. Les amorces PCR.	25
3. Augmentation de T_m et affinité.	26
4. Oligonucléotides modifiés pour une meilleure hybridation.....	27
a) Les « Minor Groove Binders : MGBs ».	27
b) Les Locked Nucleic Acids: LNAs”.....	27
c) Les « Peptides Nucleic Acid : PNA »	28
d) Les “Unlocked Nucleic Acids: UNAs”.....	29
5. La synthèse d’ADN.	30
Protection des positions 5’-Hydroxyles.....	32
Protection des amines exo-cycliques des nucléotides.	33
Synthèse sur support solide.	33
La chimie des phosphotriesters.	35
La chimie des Triesters de phosphites.....	36
La chimie des phosphoramidites.	38
Cycle de synthèse de l’ADN_.....	38
Chapitre 2 : Les acides nucléiques pour la thérapie.	41
A. Applications.	41

1. La synthèse de protéines.....	41
2. Activité au niveau de l'ADN.	43
a) La stratégie anti-gène : les « TFOs ».....	43
b) L'invasion de brin.	44
3. Activité au niveau de l'ARN.....	45
a) Stratégie Antisens.....	45
b) La stratégie du saut d'exon.....	48
c) Les aptamères.....	49
4. Le mécanisme d'ARN interférence.....	51
a) Les origines.....	51
b) Elucidation de l'extinction des gènes.....	52
c) Identification de l'intermédiaire d'extinction.....	53
d) Découverte de DICER et des endonucléases double brin.....	54
e) Identification du « slicer » ou trancheur.....	54
f) Détermination de la structure minimale du complexe RISC.....	55
g) Activité ARN interférence et traduction des ARNs messenger.....	55
h) Localisation d'Argonaute 2.....	55
i) Les petits ARNs interférents : « siRNA ».....	56
j) Les ARNs en épingle à cheveux : les shRNAs.....	57
k) Les micro-ARNs : microRNAs (miRNAs).....	58
l) Les « Antagomirs ».....	60
B. Les Petits ARNs Interférents : siRNAs.....	63
1. Structure des siRNAs synthétiques.....	63
2. Modifications des sucres.....	64
a) Modification 2'-O-Méthyle (2'-O-Me).....	64
b) Modification 2'-O-Méthoxyéthyle (2'-O-MOE).....	65
c) Modification 2,4-dinitrophényl éther.....	65
d) Modification 2' Fluoro-RNA (2' F-RNA).....	65
e) Modification 2' F-ANA.....	65
f) Modification ADN.....	66
g) Modification 4' S-RNA.....	66
h) Modification 4' S-FANA.....	66

i) Modification LNA.....	66
3. Modification des liaisons phosphate.....	67
a) Liaison phosphorothiate (PS).....	67
b) Liaison boranophosphate.....	67
c) Liaison 2'-5'.....	67
4. Conjugués de siRNA.....	68
a) Conjugués hydrophobes et lipidiques.....	68
b) Conjugués siRNA-ligands.....	68
c) Conjugués siRNA-CPP.....	69
d) Conjugués hydrophiles (PEG).....	70
e) Conjugués Aptamères.....	70
Chapitre 3 : Conjugués oligonucléotide-spermine.....	73
A. Généralités.....	73
1. La spermine.....	75
2. La spermine et les oligonucléotides.....	76
3. La « base » spermine.....	76
4. Le synthon spermine phosphoramidite.....	78
B. Les conjugués oligonucléotide-spermine cationiques.....	80
1. Les conjugués oligodésoxyribonucléotide-spermine négatifs.....	81
2. Les conjugués oligoribonucléotide-spermine positifs.....	82
C. Notre projet.....	84
Chapitre 4 : Les conjugués oligonucleotide-spermine en biologie moléculaire... 87	87
A. Introduction.....	87
B. La chimie des conjugués oligonucléotide-spermine.....	88
1. Synthèse, déprotection et purification des conjugués ARN-oligospermine.....	88
2. Analyses des conjugués oligonucléotide-oligospermine.....	90
3. Etude de stabilité des ZNAs.....	92
4. Stabilité et structure du synthon spermine.....	96
5. Synthèse du synthon spermine phosphoramidite C ₃	100
6. Stabilité des ZNAs avec le synthon spermine C ₃	101

C. Utilisation des amorces ZNAs en PCR.	102
1. <i>Résultats, discussion.</i>	118
2. <i>Conclusion.</i>	119
D. Les sondes d'hydrolyse ZNAs.	120
1. <i>Généralités.</i>	120
2. <i>Synthèse des sondes d'hydrolyse ZNAs.</i>	121
E. Utilisation des sondes d'hydrolyse ZNAs en PCR.	122
1. <i>Discussion.</i>	129
2. <i>Conclusion.</i>	130
D. Conclusion et perspectives.	130
Chapitre 5 : Les conjugués ARN-oligospermine pour la thérapie.	133
A. Introduction.	133
1. <i>La problématique de la vectorisation des siRNAs in vivo.</i>	135
B. La chimie des conjugués oligonucléotide-oligospermine.	138
1. <i>Généralités.</i>	138
2. <i>Synthèse du brin sens ARN-oligospermine.</i>	140
3. <i>Déprotection des conjugués oligonucléotide-oligospermine cationiques.</i>	142
4. <i>Stabilité des unités de spermine des conjugués dans les conditions de déprotection.</i> 144	
a) <i>Stabilité des unités de spermine lors de la déprotection de nucléobases.</i>	144
b) <i>Stabilité des unités de spermine lors de la déprotection des positions 2'-OH.</i>	145
1. <i>Purification des brins sens cationiques.</i>	148
2. <i>Caractérisation des conjugués ARN-oligospermine par spectrométrie de masse Maldi-Tof.</i>	151
3. <i>Formation des duplexes SIRNAPLUS.</i>	153
C. Article : activité biologique des SIRNAPLUS <i>in vitro.</i>	154
D. Mesures de la taille des SIRNAPLUS.	172
1. <i>Diffusion dynamique de la lumière.</i>	173
2. <i>La microscopie électronique en transmission.</i>	174
3. <i>Microscopie à force atomique.</i>	175
E. Activité biologique <i>in vivo.</i>	178

1. Etude de biodistribution.....	178
2. Résultats préliminaires d'activité in vivo.....	180
Conclusion Générale	183
Matériels et methodes	187
A. Généralités.....	187
1. Solvants et réactif chimiques.....	187
2. Spectroscopie UV-visible et mesure des températures de fusion.....	187
B. Synthèse automatisée des conjugués oligonucléotide-oligospermine.....	187
1. Synthèse ADN.....	187
2. Synthèse ARN.....	187
3. Synthèse oligospermine.....	188
4. Traitement post-synthèse.....	188
5. Clivage du support solide.....	188
6. Déprotection et purification des conjugués ADN-oligospermine.....	188
C. Etude de stabilité des conjugués oligonucléotide-oligospermine.....	188
1. Etude de stabilité des amorces PCR dans les conditions élevées de température de PCR.....	189
2. Etude de stabilité des amorces PCR dans les conditions de reprise des ZNAs dans une solution d'ammoniaque à 50 mM.....	189
3. Etude de la stabilité des amorces de PCR ZNAs dans les conditions de déprotection rapide « Ultra-Mild ».....	189
4. Etude de stabilité des sondes d'hydrolyse ZNAs en fonction du pH et du temps d'incubation.....	189
5. Etude de stabilité du domaine oligospermine.....	189
6. Stabilité en fonction du nombre de carbones entre le phosphate et l'amine...	190
7. Etude comparative de la stabilité de conjugués synthétisés avec la spermine phosphoramidite C ₃ ou C ₄	190
D. Déprotection et purification des conjugués ARN-oligospermine.....	190
1. Déprotection des conjugués ARN-oligospermine.....	190
2. Purification des conjugués ARN-oligospermine.....	191
E. Analyses HPLC des conjugués ADN-oligospermine et ARN-oligospermine.....	191
1. HPLC.....	191

2. Spectrométrie de masse Esi-Tof.....	191
3. Spectrométrie de masse Maldi ToF.....	191
4. Analyse des conjugués ARN-oligospermine sur gel de type SDS-PAGE.	192
5. Vérification de la formation des duplexes SIRNAPLUS sur gel.....	192
F. Mesure de taille des duplexes SIRNAPLUS.	192
1. Diffusion dynamique de la lumière.	192
2. Microscopie électronique en transmission.	192
3. Microscopie à force atomique.	193
4. Expérimentation animale.....	193
5. Bio-imagerie des souris.....	193
Abréviations.....	195
Références bibliographiques	199
Communications	211

INTRODUCTION GENERALE.

Au début des années 1950, il était déjà connu que l'acide désoxyribonucléique est constitué d'une chaîne 2'-désoxyribosephosphate qui porte des bases azotées de type purine (adénine et guanine) et, ou pyrimidine (cytosine et thymine). Il avait aussi déjà été admis que l'ADN est le support de l'hérédité. La question de la transmission de cette hérédité restait cependant en suspens et restait donc à élucider.

En 1950, Chargraff démontra que la quantité d'adénine est toujours égale à la quantité de thymine et que la quantité de cytosine est toujours égale à la quantité de guanine quel que soit l'espèce dont l'ADN est extrait (CHARGAFF 1950). En 1953, Franklin et Gosling ont élucidé la structure hélicoïdale de l'ADN en utilisant la technique de diffraction des rayons X (Franklin et Gosling 1953). Enfin en 1953, Watson et Crick proposèrent un modèle de structure en double hélice de l'ADN qui repose sur la complémentarité spécifique des bases azotées (Figure 1) (Watson et Crick 1953).

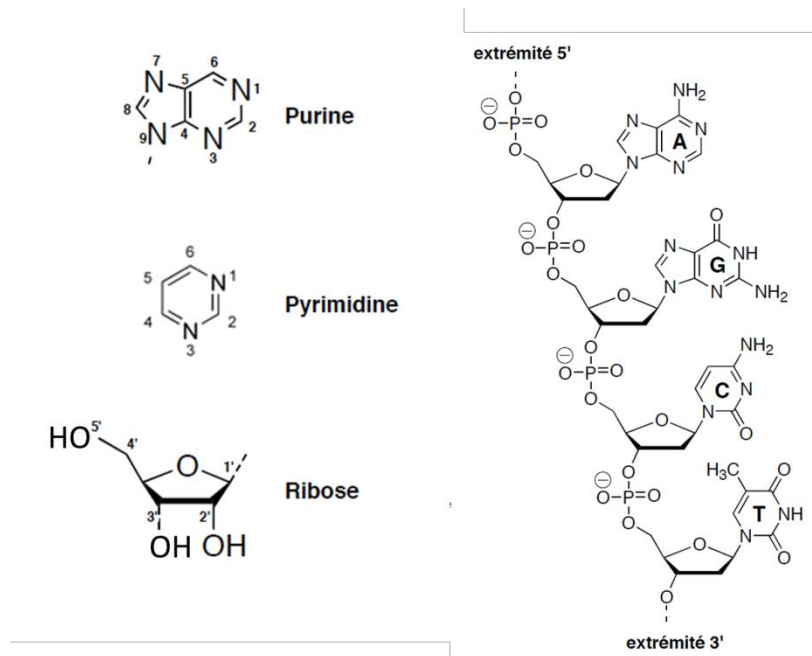


Figure 1 : Structure des bases nucléiques puriques (A G) et pyrimidiques (C T).

Après la découverte de la structure de l'ADN, sont nées de nouvelles disciplines telles que la biologie moléculaire et la chimie des acides nucléiques qui se sont beaucoup développées pour devenir des domaines de recherche indispensables.

Depuis la fin des années 1970, les oligonucléotides peuvent être produits avec des synthétiseurs automatiques. Cette synthèse se fait sur support solide et elle est de nos jours employée en routine dans les laboratoires pour produire de l'ADN ou de l'ARN nécessaire aux expériences. Ce développement de la synthèse automatisée conjugué aux progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire et à une connaissance accrue en génomique fait que l'ADN ou l'ARN peuvent être à la fois utilisés comme des outils de biotechnologie ou de diagnostic, ou des agents thérapeutiques.

La réaction de polymérase en chaîne (PCR) consiste à amplifier un fragment d'ADN en plusieurs millions de copies à partir de quelques copies grâce à l'enzyme ADN polymérase. La réaction de PCR alterne des cycles de chauffage et de refroidissement qui permettent de séparer ou d'hybrider deux brins d'un fragment d'ADN. C'est une technologie qui a énormément contribué au développement de la biologie moléculaire et qui de nos jours est utilisée en routine pour la production de longs fragments d'acide nucléique par voie enzymatique, pour la détection de séquences génomiques ou pour le diagnostic. C'est en 1983 que Kary Mullis inventa la réaction de polymérase en chaîne pour laquelle il reçut le Prix Nobel de Chimie en 1993. La PCR nécessite l'utilisation d'oligonucléotides servant d'amorces ou de sondes pour pouvoir amplifier l'ADN ou détecter une séquence cible. C'est donc le développement de la synthèse des oligonucléotides en parallèle de celui de la PCR qui a permis l'essor de cette technique.

Dans le premier chapitre de mon manuscrit, je présenterai les principales techniques de biologie moléculaire basées sur l'hybridation spécifique d'une séquence d'ADN avec sa cible. Je décrirai plus en détails les principes de la PCR et ainsi que les modifications chimiques développées pour améliorer cette technique. Je retracerai enfin les grandes étapes qui ont permis le développement de la synthèse automatisée des oligonucléotides que nous utilisons de nos jours.

Le domaine thérapeutique utilise également les oligonucléotides, comme la thérapie basée sur l'ARN interférence. Cette application utilise de petits duplexes de 21-25 paires de bases qui une fois introduits dans la cellule, clivent un ARN messager cible pour induire l'inhibition de la production de la protéine correspondante. Les duplexes de siRNAs sont habituellement formés à partir de brins d'ARN modifiés qui ont pour propriétés d'être plus stables dans l'organisme et d'avoir une meilleure affinité pour leur séquence cible que les siRNAs naturels.

Dans le deuxième chapitre de ma thèse, je présenterai les principales stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de l'ADN et surtout l'ARN. Je décrirai également le mécanisme de l'ARN interférence ainsi que les modifications chimiques introduites dans les duplexes pour améliorer la stabilité des siRNAs *in vivo*. J'introduirai également les entités moléculaires qui ont déjà été conjuguées aux siRNAs pour améliorer leur pénétration cellulaire.

Que ce soit dans le domaine de la PCR ou de la thérapie utilisant l'ARN, c'est sur une hybridation spécifique entre un oligonucléotide et sa séquence cible que sont fondées ces deux applications. Pour améliorer ces deux techniques, nous avons donc développé nos recherches sur des oligonucléotides conjugués à des unités cationiques à base de spermine destinés à améliorer l'hybridation moléculaire des acides nucléiques ou la pénétration cellulaire. La chimie des conjugués oligonucléotide-oligospermine a été préalablement initiée au sein du Laboratoire de Chimie Génétique (Faculté de Pharmacie, Illkirch). Au travers d'une collaboration étroite entre le laboratoire et la société Polyplus-transfection, nous avons continué au cours de cette thèse à comprendre, améliorer et optimiser cette chimie appliquée à des conjugués de type ADN et ARN et à des conjugués ayant une charge globale de négative à positive.

Dans le troisième chapitre, j'introduirai le concept qui consiste à conjuguer des oligocations comme la spermine à des oligonucléotides pour augmenter leur affinité pour leurs séquences cible. Je discuterai du fait de pouvoir moduler la charge globale d'un

oligonucléotide simple brin ou double brins et des apports attendus dans les deux domaines d'application étudiés.

Je décrirai ainsi la synthèse, la purification et la caractérisation des conjugués oligonucléotide-oligospermine de charge globale négative pour leur utilisation en biologie moléculaire dans la quatrième chapitre. Je présenterai également nos travaux concernant l'évaluation de la stabilité de des conjugués oligonucléotide-oligospermine et quelles modifications ont été apportées et sont proposées pour une stabilité plus optimale. Dans ce chapitre, les résultats obtenus avec nos conjugués lorsqu'ils sont utilisés comme amorce ou comme sondes en PCR seront discutés et présentés sous la forme de deux publications.

Le cinquième chapitre de cette thèse porte sur l'utilisation des conjugués oligonucléotide-oligospermine de charge globale positive. J'introduirai les avantages attendus de l'utilisation des conjugués oligonucléotide-oligospermine pour éteindre un gène cible via la voie de l'ARN interférence. Pour ce domaine d'application, les conjugués sont de nature ARN, c'est pourquoi je détaillerai la synthèse de conjugués ARN, qui est différente de celle de conjugués ADN. Je détaillerai également la formation des duplexes de siRNA cationique et leur caractérisation. Les résultats biologiques seront rapportés sous la forme d'une publication puis seront également commentés et discutés. Des premiers résultats *in vivo* compléteront ce chapitre.

Une conclusion générale suivra afin de résumer les résultats les plus marquants et ouvrir les perspectives de nos travaux.

CHAPITRE 1 : LES ACIDES NUCLEIQUES EN BIOLOGIE MOLECULAIRE.

A. UTILISATION.

1. Généralités.

L'ADN génomique humain est composé d'un peu plus de 3 milliards de paires de bases. Les variations de séquences (insertion, délétion, polymorphisme d'un seul nucléotide) représentent moins de 0.1% du génome humain. Ces variations de séquences peuvent être classées en deux catégories. La première catégorie est le polymorphisme, défini comme étant les variations d'un allèle (versions différentes d'un même gène de par sa séquence) et présentent dans le génome pour au moins 1% de la population. La deuxième catégorie de variations de séquences est appelée mutation. On parle de mutations lorsque les variations de séquences sont inférieures à 1% de la population. La détermination de variations de séquences du génome humain est nécessaire pour identifier la cause des maladies courantes, ainsi que pour choisir les éventuelles cibles thérapeutiques. C'est dans ce but que l'ADN monobrin peut être utilisé comme outil pour la biologie moléculaire grâce à sa propriété d'hybridation qui lui permet de s'associer, spontanément, spécifiquement et de manière réversible au brin portant sa séquence complémentaire. L'hybridation moléculaire se caractérise par la formation de liaisons hydrogènes entre les bases puriques et pyrimidiques constituant l'ADN. Diverses techniques d'analyses sont basées sur l'hybridation moléculaire. J'introduirai quelques-unes de ces techniques largement utilisées de nos jours.

2. Hybridation *in situ* fluorescente: FISH.

Malgré une utilisation en forte croissance des méthodes directes d'analyses utilisant des acides nucléiques, les analyses cytogénétiques restent encore très utilisées en routine. Plus de 400 000 caryotypes sont réalisés chaque année aux Etats-Unis et au Canada en utilisant l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH : « Fluorescence *in situ* hybridization »). Durant les 20 dernières années la technique FISH était très utilisée pour localiser des séquences spécifiques du génome ou pour étudier des aberrations chromosomiques. La technique FISH est une méthode cytogénétique utilisée pour détecter et localiser la présence ou non de séquences spécifiques d'ADN sur les chromosomes dans les cellules ou les tissus. Cette technique utilise des sondes fluorescentes qui viennent s'hybrider sur la partie du chromosome qui porte leurs séquences complémentaires ([Figure 2](#)). On observe ensuite au microscope à fluorescence la zone où les sondes se sont fixées sur le chromosome. L'hybridation *in situ* fluorescente est le plus souvent utilisée pour identifier certaines caractéristiques de l'ADN mais elle peut aussi être utilisée pour localiser l'ARN messager dans les tissus. D'une manière générale cette méthode permet de localiser dans l'espace et dans le temps l'expression des gènes dans les cellules et les tissus.

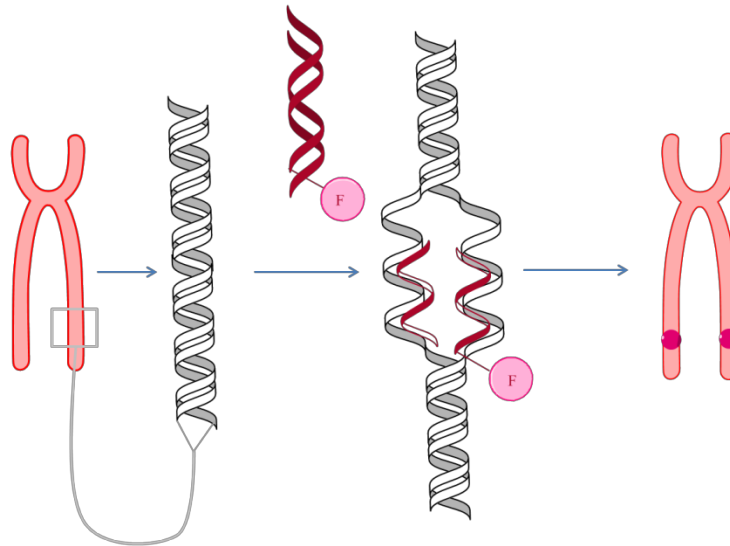


Figure 2 : Schéma du principe de la technique FISH.

Lors des analyses utilisant la technique FISH, les cellules que l'on veut étudier sont généralement fixées et perméabilisées sur une plaque de verre. La séquence d'ADN cible du chromosome en métaphase ou interphase est ensuite dénaturée avec du formamide, la double hélice est ainsi ouverte et les deux brins de la séquence cible sont séparés. La sonde marquée avec un fluorophore est ensuite mise en contact avec l'échantillon dénaturé durant 12 h pour permettre l'hybridation. On rince ensuite l'excès de sondes non hybridées en lavant plusieurs fois la plaque de verre. On observe ensuite le résultat obtenu avec un microscope à fluorescence capable d'exciter le fluorophore. On obtient ainsi des images des chromosomes étudiés portant de petites tâches fluorescentes correspondantes aux zones où se sont hybridées les sondes.

3. Southern blot et Northern blot.

Le Southern blot et le Northern blot sont deux techniques utilisées en biologie moléculaire pour étudier l'expression des gènes en détectant soit l'ADN (Southern blot) soit l'ARN (Northern blot). Ces deux techniques permettent de repérer les ADN ou ARN cibles par l'intermédiaire de sondes marquées qui s'hybrident à leurs séquences complémentaires. Il est ainsi possible de quantifier les ADN ou ARN cibles pour mettre en évidence les variations de séquences plus ou moins importantes dans le génome.

La mise en œuvre de ces techniques de « blotting » comporte plusieurs étapes. La première étape consiste à extraire l'ADN et l'ARN des échantillons à étudier, l'ADN est ensuite fragmenté par une enzyme de restriction. La deuxième étape consiste à séparer les ADN et les ARN selon leurs tailles par électrophorèse sur gel. Les sondes marquées ne peuvent pas directement s'hybrider à leurs séquences cibles dans le gel. Les bandes contenant les échantillons sont donc transférées sur des membranes en Nylon par capillarité. Les membranes en Nylon sont chargées positivement ce qui leur permet de fixer les ADN et les ARN qui sont eux chargés négativement. Le tampon de transfert utilisé contient de la formamide, un dénaturant qui permet d'éviter la formation de structures secondaires sur les

simples brins ADN et ARN. Après avoir été transférés sur les membranes, les fragments d'ADN et d'ARN sont fixés de façon covalente en utilisant un rayonnement UV. On dépose ensuite sur les membranes les sondes marquées qui vont venir s'hybrider sur leurs séquences cibles. L'excès de sondes non hybridées est ensuite éliminé par lavage, ce qui permet d'éviter une hybridation non spécifiques des sondes et donc d'éviter l'apparition d'un bruit de fond résiduel. Le résultat est observé soit grâce à des films sensibles aux rayons X si le marqueur est du phosphore ^{32}P , soit après excitation de la membrane dans le spectre UV si le marqueur est un fluorophore (Figure 3).

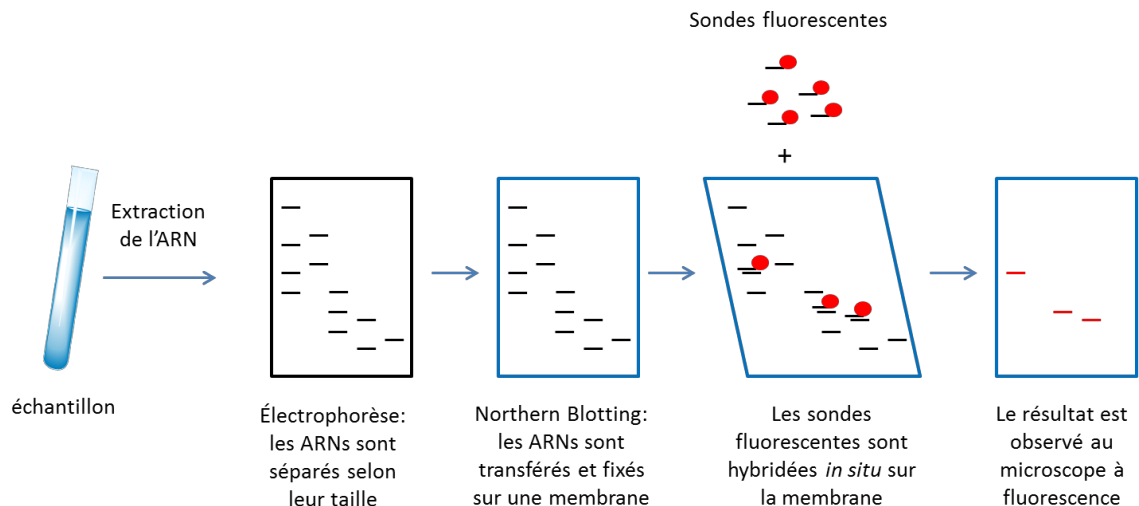


Figure 3 : Principe du Northern Blot.

4. Puce à ADN.

Dans les années 1990, une autre méthode qui se rapproche de celle-ci s'est développée : les puces à ADN. Cette méthode est également basée sur l'hybridation moléculaire des acides nucléiques. L'avantage des puces à ADN par rapport aux techniques de « blotting » est qu'elles permettent d'évaluer rapidement et simultanément l'expression de plusieurs gènes.

Les puces à ADN sont constituées d'un ensemble de fragments d'ADN fixés sur une plaque de verre recouverte d'une matrice qui permet de les accrocher sur la plaque. Chaque dépôt de fragments d'ADN contient quelques picomoles d'une séquence spécifique, ces dépôts constituent les sondes. Une plaque peut contenir 1 000 sondes par cm^2 soit quelques 12 000 sondes par plaques. L'ADN fixé sur ces sondes provient de fragments d'ADN amplifiés par PCR (ADNc, ADN complémentaire). Ces sondes ADN vont cibler l'ADNc obtenu par transcription inverse de l'ARN issu d'une culture cellulaire. Une fois que l'ARN est extrait des cultures cellulaires et que la transcription inverse a été effectuée pour obtenir la cible ADNc, cette cible est marquée avec un fluorophore qui permet de vérifier s'il y a hybridation ou non (Figure 4). L'hybridation est détectée à l'aide d'un photomultiplicateur après irradiation des dépôts avec un laser. Pour pouvoir comparer l'expression des gènes dans deux cultures de cellules différentes, on utilise deux fluorophores différents, pour la première on va utiliser par exemple la Cyanine 3 (Cy3 ; émission dans le vert) et pour la deuxième on va

utiliser la Cyanine 5 (Cy5 ; émission dans le rouge). Les dépôts des cibles différemment marquées se font sur la même plaque. Après incubation, les fluorophores sont excités avec le laser à leurs longueurs d'ondes d'excitation respectives. En superposant les images obtenues on peut identifier selon la couleur du dépôt, l'intensité d'expression de chaque gène. Pour un dépôt, si le gène est plus exprimé dans la première culture on obtient une coloration verte, si ce sont les gènes de la deuxième culture qui sont exprimés, on obtient une couleur rouge. De la même manière, si les gènes des deux cultures sont exprimés simultanément, on obtient une couleur jaune et si aucun n'est exprimé il n'y a aucune coloration.

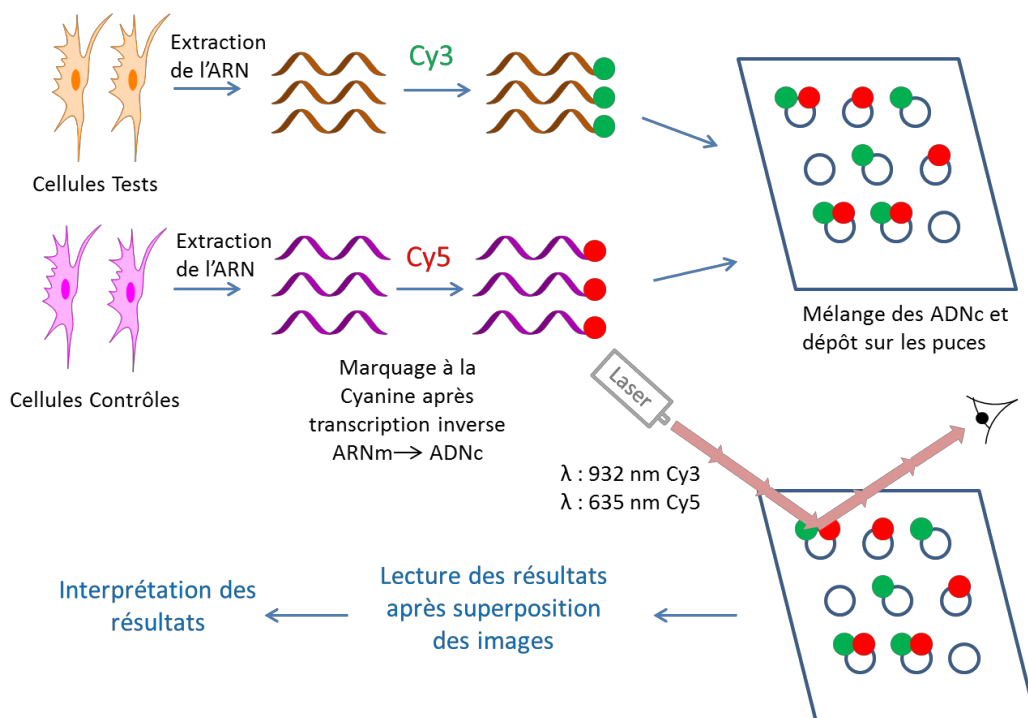


Figure 4 : Principe des puces à ADN.

5. La réaction en chaîne par polymérase : PCR.

Principe.

La réaction en chaîne par polymérase (ou PCR : « polymerase chain reaction ») est une méthode biochimique qui permet l'amplification de quelques copies d'une séquence d'ADN ou ARN double brin en plusieurs milliers voir millions de copies, c'est une amplification exponentielle (Saiki et al. 1985). C'est Kary Mullis qui développa la PCR en 1985, il reçut le Prix Nobel de Chimie pour cette découverte en 1993. En 1988, la découverte d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées : la Taq Polymérase a permis l'automatisation de la PCR (Saiki et al. 1988).

Cette méthode d'amplification est basée sur des cycles alternant des phases à haute température puis à basse température permettant la réplication enzymatique de l'ADN. Les amorces PCR contenant la séquence complémentaire de la séquence cible à amplifier et, l'enzyme ADN polymérase sont les composants les plus importants pour une amplification fiable par PCR. Le fait que l'amplification PCR soit exponentielle vient du fait que chaque nouveau double brin issu de l'amplification sert de matrice à une nouvelle amplification. La quantité d'ADN formée double donc à chaque cycle de PCR (Figure 5).

La méthode d'amplification par PCR est constituée de cycles de 3 étapes. La première étape de ce cycle consiste à chauffer le brin d'ADN que l'on veut copier à 95°C pour le dénaturer, les deux brins sont ainsi séparés. Lors de la deuxième étape, la température est ensuite réduite entre 40°C et 65°C pour permettre aux amorces PCR (oligonucléotides de 15-20 nucléotides) de s'hybrider aux séquences complémentaires à amplifier situées aux extrémités 3' de chaque brin. L'étape finale consiste à remonter la température du milieu réactionnel à 72°C, la température à laquelle la polymérase effectue l'élongation.

Il peut être aussi nécessaire de chauffer plus fort lors des premiers cycles de PCR car l'ADN à amplifier au départ est souvent plus long que les amplicons (ADN double brin issue de la réaction d'amplification). D'autre part, certaines polymérases ont besoin d'être activées à une température plus importante que celles utilisées lors des cycles de PCR.

L'efficacité d'amplification de la PCR est telle qu'au bout de 20 cycles on obtient 2^{20} copies soit 1 million de copies en quelques heures.

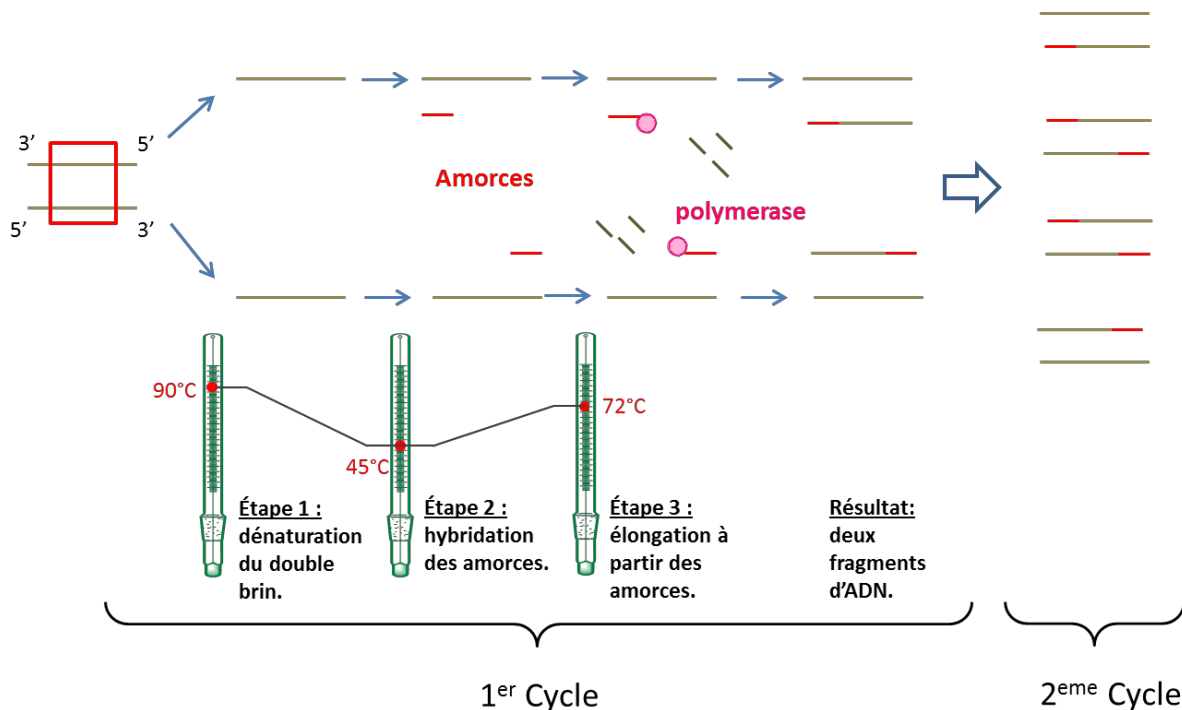


Figure 5: Principe de l'amplification par PCR.

a) La PCR quantitative.

La PCR est l'outil le plus puissant pour détecter de faibles quantités d'acides nucléiques, ce qui lui permet d'être utilisée pour quantifier l'expression des gènes. Théoriquement, pendant la réaction d'amplification de la PCR, chaque séquence cible est amplifiée proportionnellement à sa quantité présente au départ dans l'échantillon. C'est à partir de ce constat que la PCR quantitative fût développée. La technique de PCR quantitative est basée sur l'observation des amplicons révélés au bromure d'éthidium après leur séparation sur gels d'agarose (Figure 6). Le traitement de l'image du gel d'agarose obtenue permet de quantifier les amplicons par densitométrie en mesurant l'intensité des bandes du gel révélées au bromure d'éthidium. La cinétique variable de la PCR et la révélation au bromure d'éthidium qui n'est pas homogène selon les essais posent des problèmes de précision. En effet la réaction d'amplification a une cinétique qui varie selon les essais induisant une variation sur les quantités d'amplicon générés, et donc induisant de ce fait une erreur sur la quantification de l'expression des gènes.

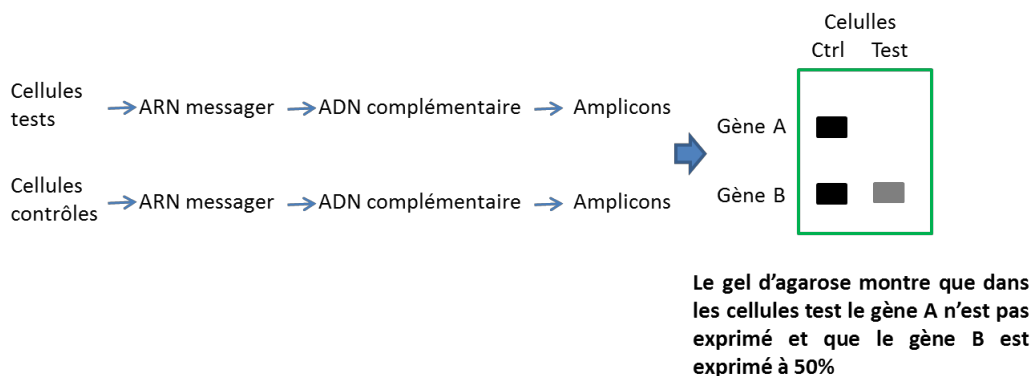


Figure 6 : Principe de la PCR quantitative.

b) La PCR en temps réel ou « Real Time PCR ».

Pour pallier le manque de précision de la PCR quantitative standard a été développée la PCR en temps réel qui a l'avantage de mesurer l'amplification de la cible plus tôt lorsque la réaction d'amplification est la plus efficace (rendement proche de 100%).

Pendant l'amplification par PCR, les fragments d'ADN sont censés être copiés à chaque cycle pour permettre une amplification exponentielle de l'ADN initiale. Ceci est vrai lors des premiers cycles lorsque les réactifs sont en excès. Plus la quantité d'amplicons augmente au cours des cycles, plus la quantité de réactifs diminue. En suivant la quantité d'amplicons produite au cours de la réaction, il apparait que la réaction de PCR peut être divisée en trois phases (Figure 7).

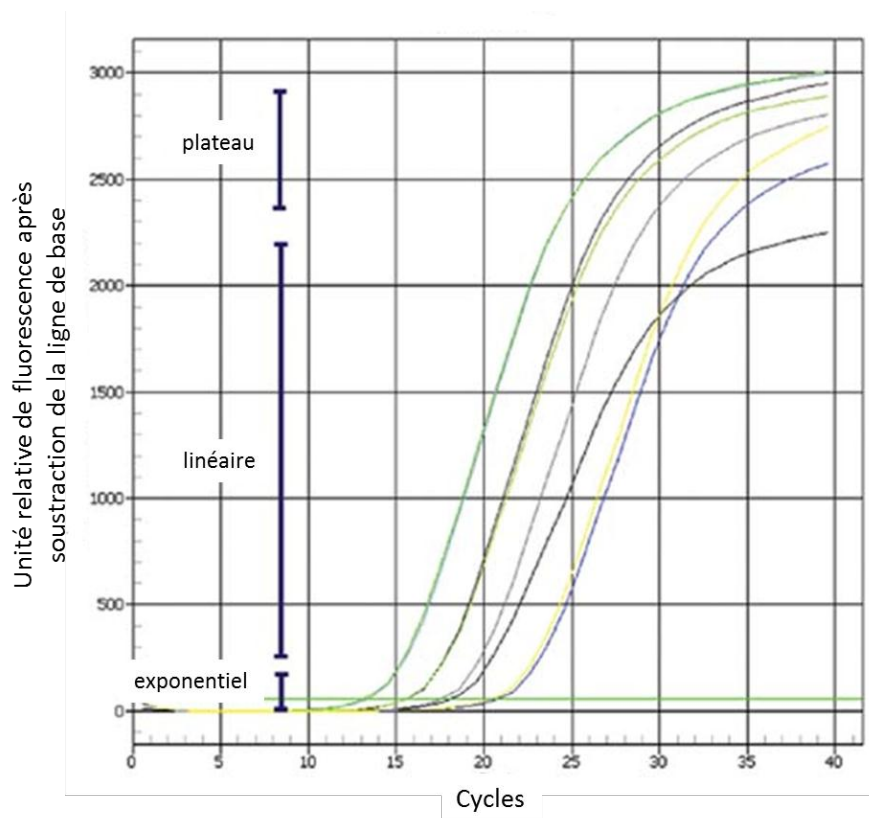


Figure 7 : Phases de la réaction de PCR quantitative.

La première phase est la phase exponentielle au cours de laquelle la réaction est effective à 100%, ce qui signifie que la quantité d'amplicons est doublée à chaque cycle. Avoir une efficacité de réaction de 100% n'est pas toujours possible et pour y arriver il faut que les conditions soient optimisées. Comme la quantité d'amplicons s'accumule exponentiellement au cours du temps, les amorces présentes en quantité constante dans le milieu réactionnel rentrent en compétition avec les amplicons qui se réhybrident entre eux. Ce phénomène induit une baisse de l'efficacité de la réaction d'amplification. Il devient significatif lorsque les quantités d'amplicons produites atteignent quelques nano-grammes par microlitre.

Au cours du temps l'efficacité de la réaction d'amplification diminue, on entre alors dans la deuxième phase de la PCR, appelée phase linéaire. Lors de cette phase la quantité d'amplicons produite à chaque fin de cycle n'est plus doublée mais variable. En effet les quantités de réactifs ne diminuent pas dans les mêmes proportions au fur et à mesure de la réaction et les amplicons formés ne sont plus exactement identiques aux copies de départ.

Lorsque tous les réactifs commencent à s'épuiser, la réaction d'amplification diminue pour finir par s'arrêter, c'est la phase plateau de la réaction d'amplification. Les variations de la réaction d'amplification lors de la phase linéaire conduisent à la formation de quantités d'amplicons finales très différentes. En effet, chaque réaction atteint son plateau à des niveaux différents d'amplicons car chacune a une cinétique d'amplification différente. Pour faire une comparaison, c'est en général lorsque la réaction atteint ce plateau d'amplification que les amplicons sont analysés en PCR traditionnelle.

Mesure de la production d'amplicons.

Comparée à la PCR standard, la PCR en temps réel mesure la quantité d'amplicons produite à chaque cycle d'amplification en utilisant des composés fluorescents. Cette quantification en temps réel s'effectue en marquant puis en détectant les amplicons produits grâce à un marqueur fluorescent qui vient s'intercaler dans le petit sillon des amplicons formés. Par rapport à la PCR standard, la PCR en temps réel permet d'augmenter la vitesse d'analyse en réduisant le nombre de cycles. Elle a aussi l'avantages d'être plus précise et de s'affranchir de l'analyse finale par gel d'électrophorèse.

Mise en œuvre de la PCR en temps réel.

La PCR en temps réel suit un protocole multi-étapes qui exige d'utiliser un ARN de départ très pur, de procéder à une conversion optimale de l'ARN en ADN complémentaire et qui nécessite également une détection sensible et précise. Grâce au développement des kits commerciaux, il est maintenant facile de purifier l'ARN à moindre coût (plus besoin de préparation et de validation des réactifs). Il est aussi facile de former le brin d'ADN complémentaire en utilisant les enzymes de transcription inverse directement vendues avec les réactifs nécessaires à la réaction de transcription. Habituellement, le fournisseur de l'enzyme indique les conditions optimales pour que la réaction de transcription inverse soit la plus efficace. Pour obtenir des résultats fiables, la PCR en temps réel nécessite l'optimisation des conditions de réaction.

La PCR en temps réel qui est une méthode quantitative est habituellement utilisée pour analyser l'expression des gènes, analyser les polymorphismes de simple nucléotide, ou encore pour analyser les aberrations chromosomiques.

B. STRUCTURE.

1. Généralités.

Toutes les techniques décrites précédemment reposent sur une propriété des acides nucléiques : leur capacité à s'hybrider spécifiquement à leur séquence complémentaire. L'hybridation est le processus qui permet de former des liaisons non covalentes de type liaisons hydrogènes entre les deux brins complémentaires d'acides nucléiques pour former un duplexe. Si une seule base d'un brin n'est pas complémentaire alors l'hybridation est énergétiquement moins favorable. La stabilité des duplexe formés peut être évaluée en déterminant la température à laquelle les deux brins complémentaire vont s'hybrider, plus la température est élevée plus le duplexe est stable.

La température de fusion est la température à laquelle 50% des doubles brins sont désappariés : c'est la valeur de référence de la stabilité du duplexe. La séparation ou dénaturation des doubles brins d'ADN est généralement obtenue en chauffant à la température qui permet de rompre les liaisons hydrogènes entre les deux brins.

L'énergie nécessaire pour la séparation des deux brins du duplexe d'ADN dépend de certains facteurs dont :

1. La longueur des simples brins : plus le duplexe est long plus il contient de liaisons hydrogènes et plus il va falloir d'énergie pour séparer les deux brins.
2. La composition en bases : les paires de bases GC contiennent plus de liaisons hydrogènes que les paires de bases AT, il en résulte donc que plus le duplexe est riche en GC plus il va être difficile de séparer les deux brins.
3. Son environnement chimique : la présence de cation (Na^+) stabilise les duplexes, au contraire les dénaturants chimique tels que la formamide et l'urée déstabilisent le duplexe en rompant les liaisons hydrogènes.

2. Les amorces PCR.

Une amorce PCR est un brin d'acides nucléiques qui sert d'initiateur à la synthèse d'ADN. Ces amorces sont nécessaires pour que les enzymes qui catalysent la réplication de l'ADN, les ADN polymérases puissent ajouter les différentes bases au brin d'ADN existant. L'enzyme ADN polymérase commence la réplication à l'extrémité 3' de l'amorce et copie le brin opposé. Pour qu'une amorce soit spécifique et robuste elle doit avoir les propriétés suivantes :

1. avoir une grande affinité pour sa cible ;
2. être discriminante envers les mauvaises séquences cibles ;
3. rester efficace indépendamment de la concentration ;
4. rester efficace indépendamment de la température ;
5. rester efficace indépendamment de la composition du solvant (sels).

Séquence de l'amorce.

D'une manière générale, les amorces PCR sont efficaces et spécifiques lorsque, le choix de la séquence et la concentration sont optimaux. La partie terminale 3' de l'amorce est déterminante pour la spécificité et la sensibilité de l'amorce. Une amorce ne doit pas être constituée de plus de 3 bases G ou C consécutives au risque de favoriser une hybridation non spécifique de cette dernière (Kwok et al. 1990). Il faut aussi s'assurer que les amorces ne peuvent pas former de dimères de types épingle à cheveux, de dimères 3'-3', de dimères 5'-5' (Figure 8). Lorsqu'il se forme des dimères 5'-5', la réaction d'amplification n'est pas possible.

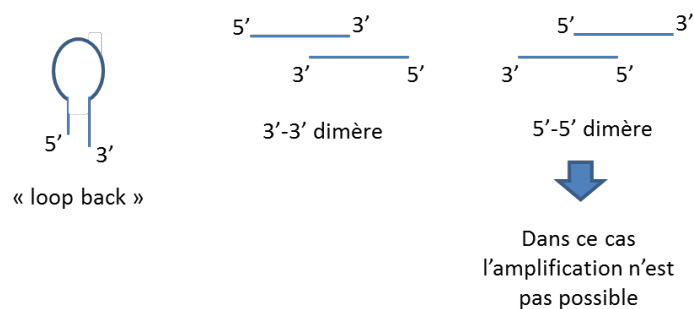


Figure 8 : Dimères d'amorces.

La longueur des amorces.

Habituellement, les amorces ont une longueur comprise entre 18 et 30 nucléotides. Théoriquement une amorce de 18 nucléotides est complémentaire d'une seule séquence du génome. En effet, si on considère le choix possible entre quatre bases pour chaque nucléotide de l'amorce, on obtient $4^{18}=7 \times 10^{10}$ combinaisons d'amorces possibles. Sachant que le génome de la plupart des cellules eucaryotes contient environ 10^9 - 10^{10} paires de bases, il est donc impossible qu'une amorce soit complémentaire de 2 séquences cibles. Par exemple, une amorce de seulement 15 nucléotides a plus de chance de trouver plus d'une cible dans le génome. Utiliser une amorce plus courte conduirait à une amplification PCR non spécifique.

La température d'hybridation.

C'est le point le plus critique concernant la spécificité de la réaction de PCR, si la température d'hybridation est trop élevée alors il n'y a pas d'hybridation et si la température est trop faible, les problèmes de mésappariement commencent à apparaître. La température d'hybridation est souvent différente de la température de fusion estimée, même si on utilise une paire d'amorces avec des températures de fusions similaires. En générale au départ, la température d'hybridation est fixée environ 5°C en dessous de la température de fusion, puis elle est ajustée pour améliorer la spécificité et l'efficacité lors de tests d'optimisation.

Concentration de l'amorce.

La concentration de l'amorce lors d'une réaction d'amplification par PCR est généralement comprise entre 100-900 nM. Pour la plupart des applications PCR la concentration d'amorces utilisée est d'environ 200 nM. Si la concentration d'amorces est trop élevée il y a plus de chances de perdre la spécificité en augmentant les mésappariements. Au contraire une concentration en amorce trop faible essouffle la réaction avant la fin ce qui induit un faible rendement en produit désiré.

3. Augmentation de T_m et affinité.

En PCR, il est important d'optimiser la température d'hybridation et d'élongation car c'est le facteur qui détermine l'efficacité de la réaction. Pour augmenter la vitesse d'hybridation et la spécificité, il faut travailler à la température d'hybridation la plus haute possible sans diminuer le temps de réaction. En effet, plus la température d'hybridation est élevée et plus on est proche de la température à laquelle l'ADN polymérase est active (72°C). L'écart de température entre l'étape d'hybridation et l'étape d'élongation est ainsi réduit, on perd donc moins de temps pour chauffer l'échantillon entre ces deux étapes. Pour des laboratoires qui utilisent la PCR quotidiennement, ce gain de temps n'est pas négligeable.

Pour qu'une amorce soit efficace, il faut donc que cette dernière ait une température de fusion (T_m) élevée tout en gardant son affinité pour sa cible. Dans le but d'augmenter la T_m , diverses modifications chimiques ont été faites sur les amorces. Pour cela, certains greffent des groupements intercalants de l'ADN sur les amorces, d'autres rigidifient la structure des amorces, d'autre encore suppriment les charges négatives des amorces pour éviter les

répulsions avec leurs cibles. Je présenterai dans le paragraphe suivant certaines de ces modifications qui permettent d'augmenter la vitesse et/ou la stabilité d'hybridation tout en gardant une bonne affinité.

4. Oligonucléotides modifiés pour une meilleure hybridation.

a) Les « Minor Groove Binders : MGBs ».

Le premier groupement intercalant greffé sur une amorce de PCR dans le but d'augmenter l'affinité de l'amorce en réduisant sa taille (à pour effet direct de réduire les répulsions de charge) a été décrit par Afonina et ses collègues en 1997 (Figure 9). (Afonina et al. 1997; Kutuyavin et al. 2000). Certaines techniques de PCR nécessitent l'utilisation d'amorces plus courtes comme par exemple celle du gène *hunting*, c'est pourquoi Afonina et ses collègues ont synthétisé des amorces plus courtes sur lesquelles a été greffé un dérivé d'antibiotique intercalant. Ce dérivé d'antibiotique est le tripeptide 1.2-dihydro-(3H)-pyrrolo [3.2-e]indole-7-carboxylate qui a pour propriété de se glisser dans le petit sillon de la double hélice d'ADN. Greffé en position 5' d'une amorce, ce groupement intercalant permet d'augmenter l'affinité de l'amorce pour sa cible et donc d'augmenter la T_m de l'hybride formé.

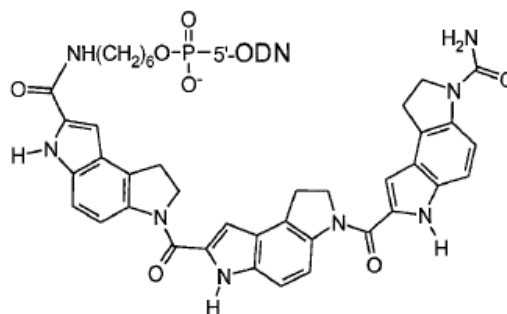


Figure 9: Structure du tripeptide 1.2-dihydro-(3H)-pyrrolo[3.2-e]indole-7-carboxylate.

b) Les Locked Nucleic Acids: LNAs".

La synthèse des « Locked Nucleic Acids » ou LNA a été décrite pour la première fois par le groupe de Wengel en 1998 (Kumar et al. 1998). Les LNAs sont des nucléotides modifiés dont le pentose a été rigidifié par le biais d'une liaison méthylène entre le carbone de la position 4' et l'oxygène de la position 2' (Figure 10).

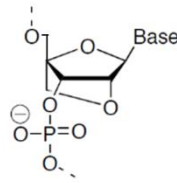


Figure 10 : Structure des LNAs.

Arora et ses collègues ont montré que les oligonucléotides portant une base LNA forment des duplexes plus stables que les duplexes sans modification (Arora et al. 2008). Kurreck et ses collègues ont montré que la T_m d'un oligonucléotide augmente de 1,5 à 4°C par LNA introduit dans sa séquence (Kurreck et al. 2002). Les LNAs introduits dans la séquence d'un oligonucléotide augmentent l'affinité pour sa cible en augmentant sa T_m . Les oligonucléotides simple brin rigidifiés par l'introduction de quelques LNAs dans leurs séquences se pré-organisent pour la formation des duplexes, qui de ce fait nécessite moins d'énergie pour l'hybridation. Les LNAs sont commercialisés sous forme de phosphoramidite, il est donc très facile de les intégrer dans la synthèse automatisée des oligonucléotides. Du fait de la rigidité apportée par les LNAs et d'effets de position, la prédiction (design) des amorces PCR contenant des LNAs n'est pas toujours facile.

c) Les « Peptides Nucleic Acid : PNA »

A l'inverse des LNAs, les acides nucléiques peptidiques ou PNAs ne sont pas des structures plus rigides. Ceux sont des analogues non naturels de l'ADN. Les pentoses des nucléotides sont remplacés par des unités N-(2-aminoéthyl)-glycine reliées entre elles par des liaisons peptidiques qui ont pour propriété de ne porter aucune charge (Figure 11).

Leur synthèse a été décrite pour la première fois en 1991 par Nielsen et ses collègues (P. E. Nielsen et al. 1991). Les PNAs sont capables de former des liaisons hydrogènes de type Watson-Crick (Egholm et al. 1993). Le fait que les PNAs soient neutres permet de diminuer les répulsions électrostatiques entre les brins du duplexe, ce qui les rend plus affins. L'hybridation avec la séquence cible est donc améliorée et les duplexes formés sont plus stables tout en restant spécifiques (Pellestor et Paulasova 2004). Une autre propriété est leur résistance aux nucléases car ils ne renferment pas de liaisons phosphodiesters.

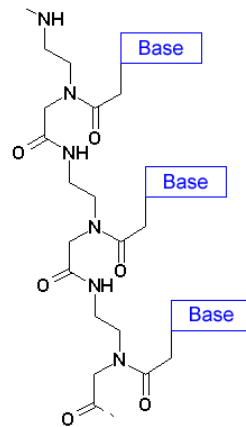


Figure 11 : Structure des PNAs.

d) Les “Unlocked Nucleic Acids: UNAs”.

Les UNAs (« Unlocked Nucleic Acid ») monomères sont des dérivés d’ARN acyclique dont il manque la liaison entre les carbones C2-C3 du pentose (P. Nielsen, Dreijøe, et Wengel 1995)(Figure 12). Les UNAs ont la propriété de diminuer la stabilité des duplexes. Positionnés stratégiquement dans la séquence, ils peuvent soit agir comme une base universelle et diminuer la discrimination des mésappariements, soit augmenter l’hybridation spécifique en augmentant la discrimination des mésappariements. L’insertion graduelle de bases UNAs dans une séquence diminue de 5-10°C la température de fusion du duplexe par unité UNA introduite. Il en résulte donc une diminution graduelle de la stabilité thermodynamique du duplexe. Placer une ou deux modifications UNAs proches de l’extrémité 3’ de l’oligonucléotide augmente sa stabilité face aux nucléases, cependant les modifications UNA ne sont pas aussi résistantes que des modifications phosphorothiates ou méthylphosphonates. Laursen et ses collègues ont montré que les modifications UNAs sont compatibles avec le mécanisme d’ARN interférence et peuvent améliorer l’efficacité des siRNAs à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ils ont aussi montré que les propriétés déstabilisantes des UNAs ont l’avantage d’améliorer l’efficacité des siRNAs qui portent déjà beaucoup d’autres modifications chimiques comme les LNAs par exemple (Laursen et al. 2010). Les UNAs s’avèrent donc être très utiles lorsque l’on souhaite induire une déstabilisation du duplexe.

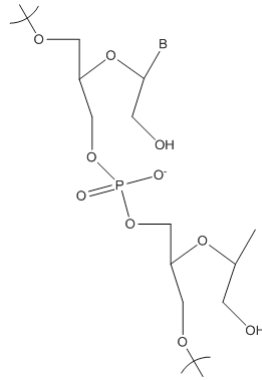


Figure 12 : Structure des UNAs.

5. *La synthèse d'ADN.*

Toutes ces avancées concernant l'hybridation des oligonucléotides ont été rendues possibles grâce à la démocratisation de leur synthèse et notamment grâce à l'utilisation de la chimie des phosphoramidites qui permet la synthèse des oligonucléotides en routine au laboratoire. Dans la suite du paragraphe seront décrites les étapes qui ont permis l'automatisation de la synthèse des oligonucléotides.

Un oligonucléotide est défini comme étant un fragment d'acide nucléique comportant moins de 50 nucléotides. Mais depuis une trentaine d'années la définition inclut les oligonucléotides synthétiques sans distinction de taille. Ensuite avec la découverte de la structure de l'ADN en double hélice qui montre le lien entre la structure chimique et les résultats biologiques observés, fût introduit le terme de biologie moléculaire. Ce terme étant défini comme la science dont la recherche se fait à l'interface entre la biologie et la chimie. Les chimistes ont ainsi commencé à synthétiser des bio-macromolécules (protéines et acides nucléiques), puis ils ont élucidé leurs structures. Les industries de biotechnologies ont ainsi vu le jour à travers des recherches sur les systèmes biologiques au niveau moléculaire. Leur but était de reproduire et de modifier ces systèmes biologiques grâce notamment à la synthèse de protéines recombinantes et aux techniques de clonage, qui permettent de créer de nouvelles biomolécules.

La chimie de la synthèse des peptides (ou petites protéines) étant plus simple que celle des oligonucléotides, elle s'est développée plus vite. Par la suite Vega Technologie a mis sur le marché le premier synthétiseur d'oligonucléotides. Ce synthétiseur utilisait une chimie peu efficace en termes de rendement. De nouveaux développements restaient donc à réaliser pour rendre la synthèse automatisée plus performante et fiable.

Le début des recherches sur le génome humain date de la collaboration entre le Prof. Marvin Caruthers et le Prof. Leroy Hood qui ont introduit au début des années 1980 le premier synthétiseur utilisant la chimie des phosphoramidites en créant la société Applied Biosystem Incorporated (ABI). Beaucoup de laboratoires ont maintenant accès en routine à la synthèse

automatisée d'oligonucléotides qui leurs sont nécessaires à la compréhension du fonctionnement des systèmes biologiques.

L'invention de la réaction en chaîne par polymérase dans les années 1980 par Mullis à permit un formidable essor de la synthèse automatisée d'oligonucléotides à travers de très nombreuses applications de plus en plus pointues permettant le séquençage du génome humain.

Le premier di-nucléotide.

La première synthèse d'un fragment d'acide nucléique bi-thymine fût réalisée en 1955 par Michelson et Todd. Ils ont formé un lien phosphate entre deux thymidines en préparant dans un premier temps un 3' chlorure de phosphoryle de thymidine protégé en position 5' par un groupement benzoyle à partir de chlorure de phosphoryle phényle. Ce composé est ensuite couplé sur la position 5' hydroxyle de la thymidine protégée en position 3' (Figure 13). Cette réaction est assez efficace mais lente. Le problème majeur est le fait que l'intermédiaire chlorure de phosphoryle n'est pas très stable.

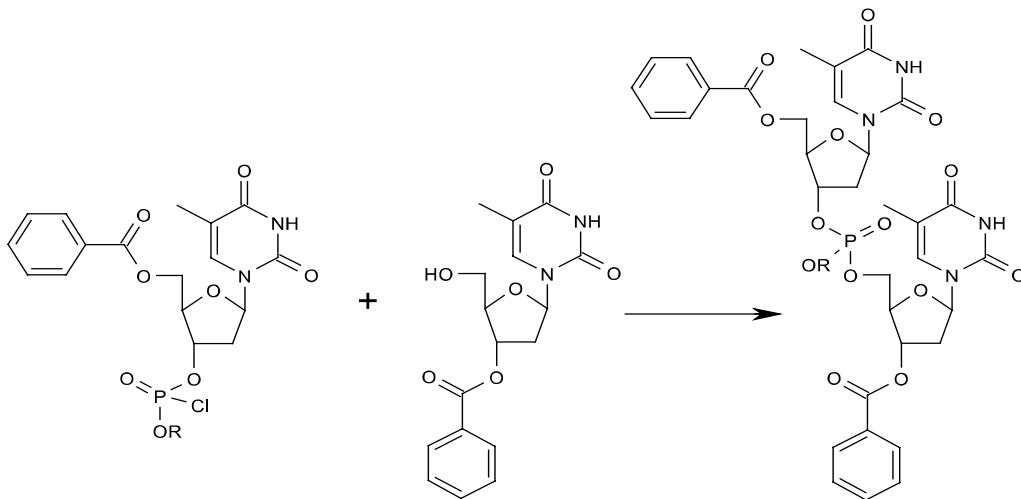


Figure 13 : Méthode de couplage de Michelson et Todd.

Le modèle de Khorana.

Dans les années 1950, Khorana introduit deux nouveaux concepts qui permettent de synthétiser des oligonucléotides synthétiques plus longs que quelques nucléotides :

Le premier concept est une protection « on-off » *via* le diméthyltrityle qui permet la synthèse cyclique des oligonucléotides. Ce concept est toujours utilisée pour la synthèse automatisée aujourd'hui (Schaller et al. 1963; Smith et al. 1962).

Le deuxième concept est l'introduction de nucléotides phosphorylés stables qui peuvent être couplés après avoir été activés. On utilise toujours de nos jours cette chimie dite « chimie des phosphoramidites », mais avec une étape d'oxydation en plus lors du cycle de couplage des nucléotides.

Pour plus de stabilité, Khorana remplace les chlorures de phosphoryles hydrolysables. Il synthétise des nucléotides 3' phosphate protégés en position 5' à partir de phosphorochloridate qui sont ensuite hydrolysés en monophosphoester. Ces nucléotides 3' phosphate protégés en position 5' sont ensuite activés utilisant la N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCC) comme réactif de condensation, pour ensuite réagir avec la position 5' hydroxyle d'un autre nucléotide protégé en position 3' (Figure 14).

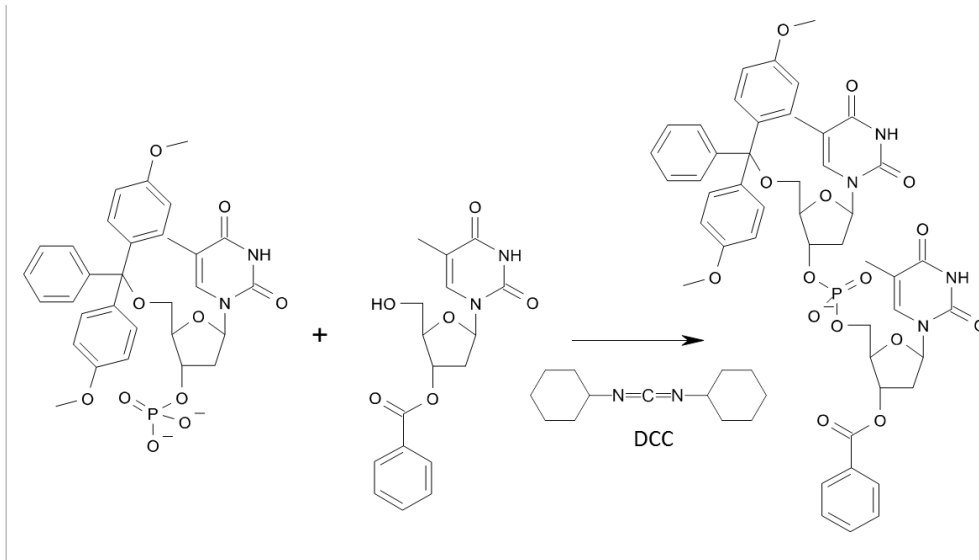


Figure 14 : Méthode de couplage de phosphodiesteres de Khorana.

Grâce à cette nouvelle méthode rapide Korana synthétisa en 1970 un ARN de 72-mère (Agarwal et al. 1970).

La limite de cette méthode est le fait que le phosphate n'est pas protégé, ce qui conduit à la formation de composés branchés. En effet, d'autres nucléotides peuvent être couplés sur les liaisons phosphates inter-nucléotidiques. Ces composés branchés se forment au fur et à mesure de l'élongation et se révèlent très difficiles à purifier.

Pour pouvoir avoir un cycle de synthèse par étape ne nécessitant pas de purifications entre chaque cycle de couplage, Khorana a développé une stratégie où les groupements protecteurs sont clivés sélectivement et quantitativement. Ces dernières conditions sont cruciales pour obtenir des rendements de couplages quantitatifs.

Protection des positions 5'-Hydroxyles.

Pour éviter la dépurination, il est recommandé de ne pas utiliser d'acide fort pour effectuer les déprotections. Khorana s'est donc tourné vers le groupement protecteur diméthoxytrityle (DMT) puisque il est clivable avec un acide faible.

Le DMT se clive facilement car le carbocation issu du clivage est très stable du fait que son orbital électronique π se délocalise facilement entre les phényles. Comme beaucoup de carbocation le DMT est coloré quand il est ionisé : il est de couleur orange intense en milieu acide (Figure 15). C'est grâce à cette couleur orange qui révèle un très haut coefficient d'extinction que l'on peut déterminer aisément sa densité optique même à faible

concentration. On peut ainsi déterminer l'efficacité de chaque cycle de couplage en mesurant la quantité de DMT clivé et la comparer avec la quantité de DMT clivé au cycle précédent.

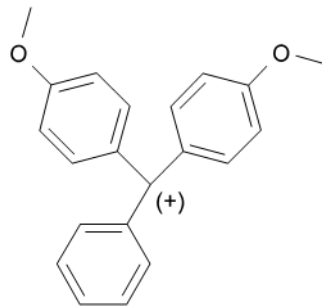


Figure 15 : Carbocation diméthoxytrityle de couleur orange en milieu acide.

Protection des amines exo-cycliques des nucléotides.

Khorana a aussi introduit les protections des amine exo-cycliques des nucléotides telles que nous les connaissons aujourd'hui comme protections standards, avec peut-être l'exception de la cytosine protégée avec une fonction acétyle qui est plus labile que la protection benzoyle (Brown et al. 1979) (Figure 16).

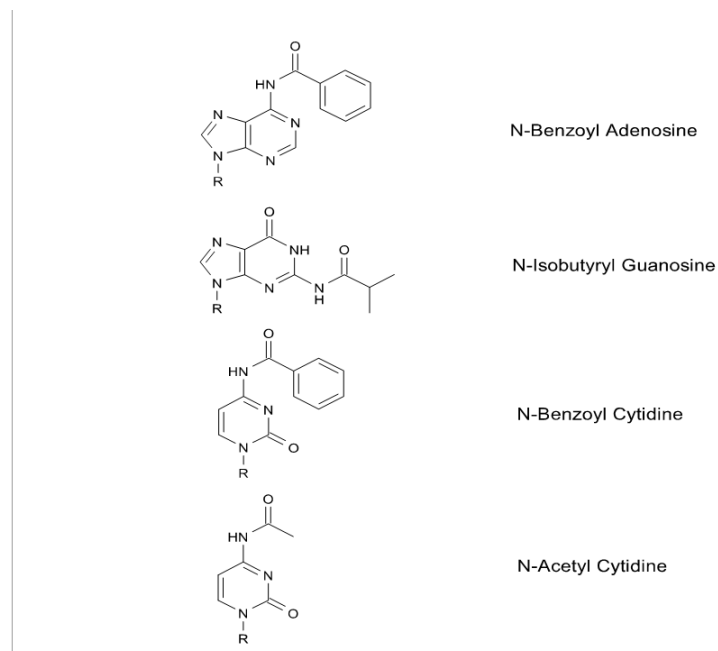


Figure 16 : Groupements protecteurs des amines exocycliques.

Synthèse sur support solide.

Dans les années 1960, Letsinger initia la synthèse peptidique sur support solide en suivant un cycle synthétique qui permet d'ajouter les unités selon la séquence désirée. L'amélioration majeure introduite dans ce cycle était la filtration du support solide qui simplifiait énormément la procédure (Robert L. Letsinger et Kornet 1963; R. L. Letsinger et al. 1964). Murrieffield qui travaillait aussi sur la synthèse des peptides sur support solide fut le premier à publier ses travaux sur la synthèse supportée. Il obtenu en 1994 le Prix Nobel de Chimie pour l'invention de la synthèse sur support solide.

Letsinger concentrera ensuite ses recherches sur la synthèse supportée appliquée aux oligonucléotides. Le premier support solide développé était appelé « popcorn », c'était un polymère de styrène-divinylbenzène qui avait l'inconvénient de gonfler dans certains solvants. En 1965, Lestingner publiait le premier papier décrivant la synthèse sur support solide des premiers oligonucléotides dimère et trimère.

Une désoxycytidine (dC) fut couplée par l'intermédiaire de son amine en position 4 au chlorure d'acide greffé sur un support solide pour former une liaison amide potentiellement clivable en milieu basique (Figure 17). Lors de cette synthèse la position 3' hydroxyle était protégée par un groupement benzoyle et la position 5' hydroxyle était protégée par un groupement DMT. Il était ainsi possible d'élonguer l'oligonucléotide en clivant dans un premier temps le DMT avec un acide, puis une fois l'oligonucléotide élongué la liaison amide attachant l'oligonucléotide au support solide était clivée avec une base faible.

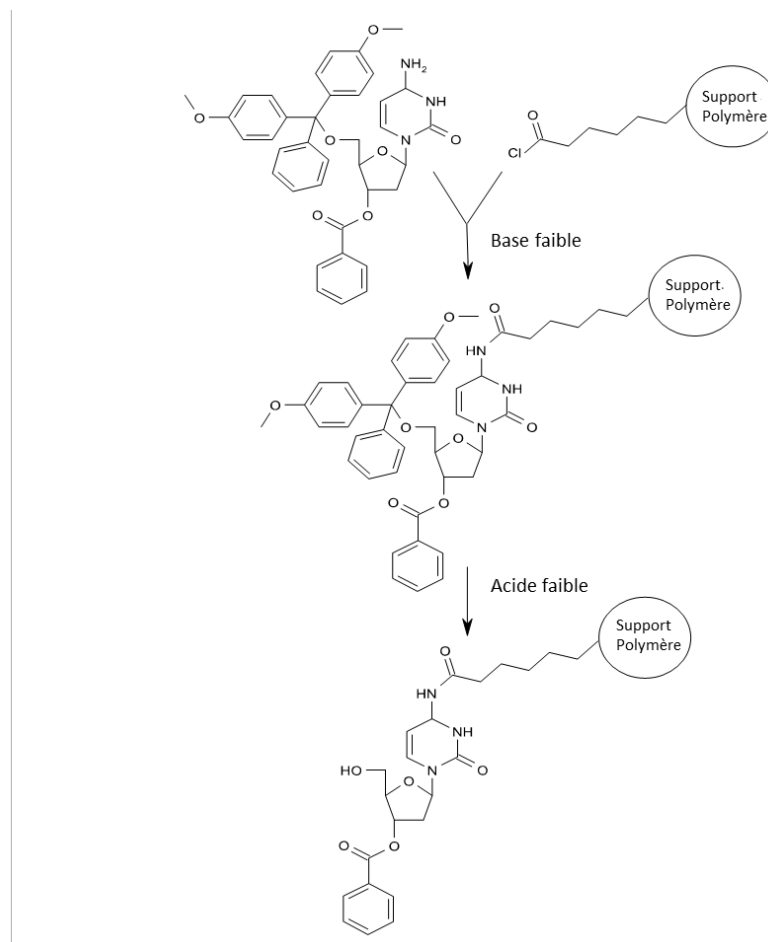


Figure 17 : Couplage d'une désoxycytidine sur un support solide.

Lestinger détermina ensuite qu'il était préférable d'accrocher le nucléotide au support par la position 3' hydroxyle comme nous le trouvons aujourd'hui.

La chimie des phosphotriesters.

En 1969, Letsinger a décrit la première synthèse d'oligonucléotides utilisant la chimie des phosphotriesters (Robert L. Letsinger et Ogilvie 1969). L'avancée majeure décrite dans cette publication était l'utilisation du groupement β -cyanoéthyle pour protéger le groupement phosphate (Figure 18). Cette modification permettait d'éviter les réactions secondaires formant des ramifications sur la liaison inter-nucléotide phosphate (Robert L. Letsinger, Ogilvie, et Miller 1969) .

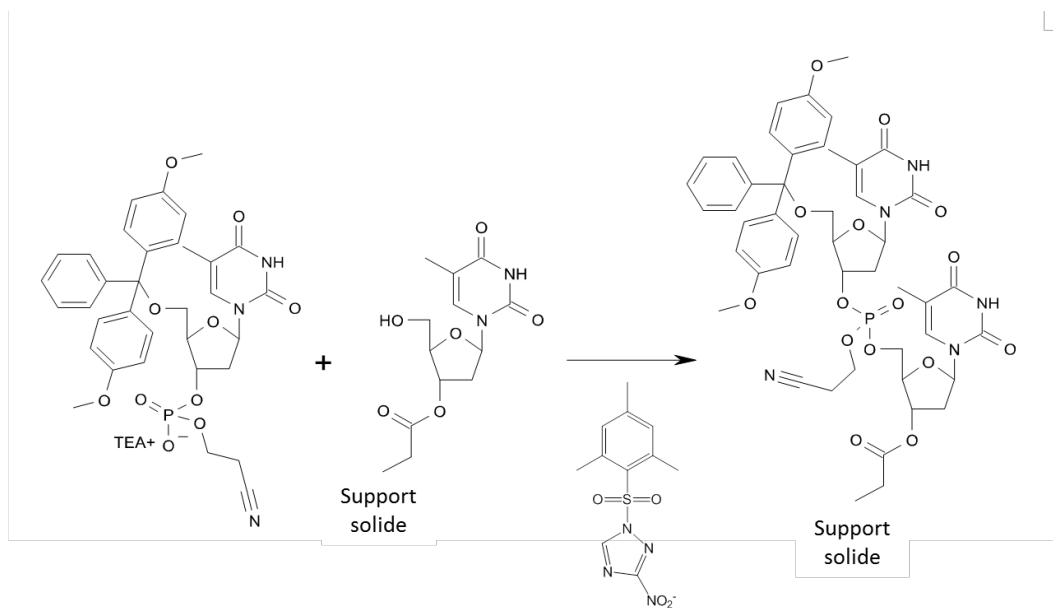


Figure 18 : Chimie des phosphotriesters.

L'efficacité de cette chimie des phosphotriesters se révéla efficace et déboucha sur la fabrication des premiers synthétiseurs automatiques et semi-automatiques par Vega Biotechnologie. Un nouvel acteur dans le domaine des oligonucléotides Ron Cook, a introduit à la fin des années 1970 le synthétiseur d'oligonucléotides SAM I par le biais de son entreprise Biosearch. Ce synthétiseur automatique se révéla être le plus populaire de son temps.

Ces nouveaux synthétiseurs permettaient ainsi à des personnes non chimistes de produire aisément des oligonucléotides avec la séquence désirée. L'industrie fut ainsi préparée aux nouvelles techniques émergentes telles que la PCR ou le séquençage (« gene mapping ») par exemple.

Cette nouvelle méthode de synthèse utilisant la chimie des phosphotriesters restait cependant limitée par le fait que les rendements de couplage de chaque nucléotide atteignaient au maximum 97% avec une moyenne égale à 95%. Cette limitation induisait que la longueur des oligonucléotides synthétisés excédait rarement les 20-mère. L'autre gros

problème majeur de cette méthode était le fait que la réaction de couplage prenait plus d'une heure et demie par nucléotide.

La chimie des Triesters de phosphites.

Au milieu des années 1970, Letsinger a publié ses travaux sur la synthèse des oligonucléotides utilisant la chimie des triester de phosphites (R. L. Letsinger et al. 1975; Robert L. Letsinger et Lunsford 1976). Cette chimie utilisait le phosphore réactif au nombre d'oxydation 3 : P(III) à la place du phosphore au nombre d'oxydation 5 : P(V) utilisé dans la chimie des phosphotriesters (Figure 19). Cette méthode nécessitait donc une étape supplémentaire d'oxydation pour obtenir le phosphore à l'état d'oxydation naturelle : le phosphore P(V). L'avantage majeur de cette méthode est le fait que le temps de couplage de chaque nucléotide est ainsi énormément réduit en passant par l'intermédiaire monochlorure de phosphite très réactif.

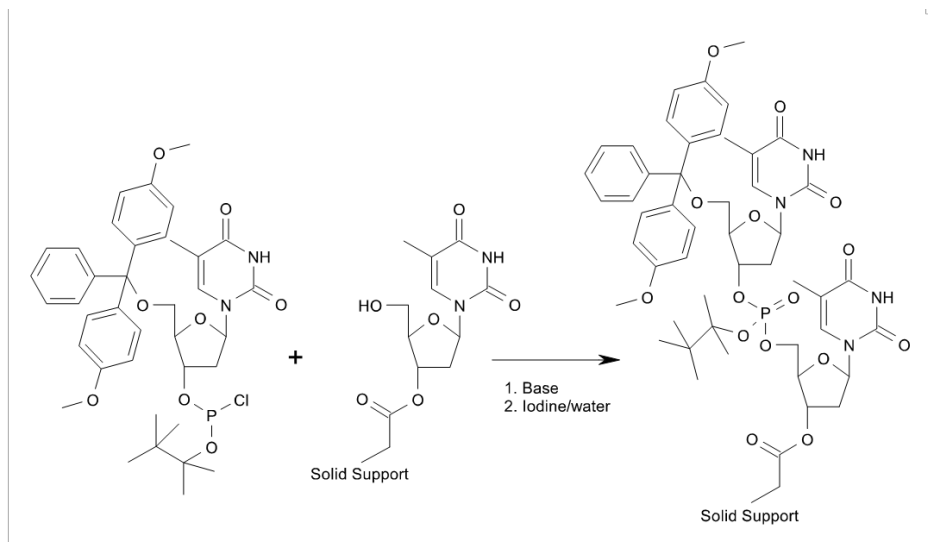


Figure 19 : Chimie des triesters de phosphite.

Le fait que le P(III) est plus réactif que le P(V) n'était pas une évidence vu que le P(V) est censé être plus réactif à une attaque nucléophile compte tenu de son électro-négativité. Cette différence de réactivité s'explique par le fait que la formation de l'intermédiaire de réaction P(III) nécessite moins d'énergie que celle de la formation de l'intermédiaire de réaction P(V). L'intermédiaire de réaction est sous forme de bipyramide trigonale (Figure 20). La double liaison de l'oxygène du P(V) freine d'avantage la transition de la forme tétraèdre à la forme plane que la paire d'électrons libres du phosphore.

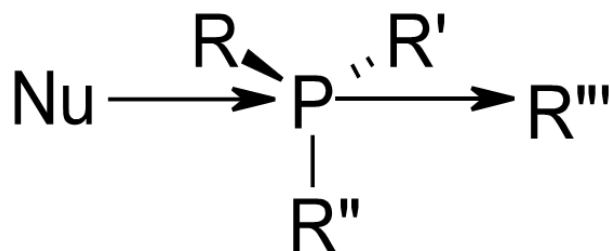


Figure 20 : Intermédiaire de réaction P(III) bipyramide trigonale.

La structure doit ensuite être stabilisée en oxydant le triester de phosphite en phosphate. Cette oxydation est nécessaire à chaque étape du cycle de couplage pour éviter la dégradation qui interviendrait avec l'acide utilisé pour la déprotection des positions hydroxyles en 5'. L'oxydation du phosphore se fait en quelques secondes par l'intermédiaire d'un mélange iode/eau.

Cependant le nucléotide intermédiaire monochlorure de phosphite est facilement hydrolysable car très réactif, il est donc très difficile à conserver. De plus, la formation de dimères 3'-3' demeure importante (Figure 21). L'utilisation d'un faible nombre d'équivalents réduirait donc l'efficacité de couplage. A l'inverse, augmenter la concentration ne permettrait pas de contrôler la réaction.

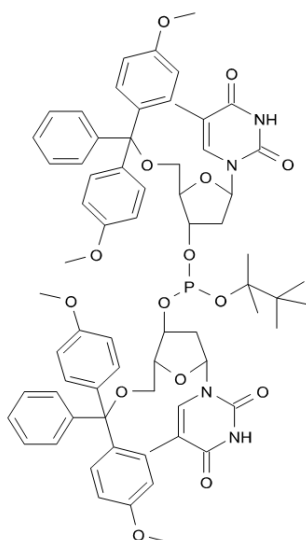


Figure 21 : dimères 3'-3'.

Pour réaliser les couplages en utilisant la chimie des triesters de phosphites il fallait préparer les nucléotides juste avant les couplages en les faisant réagir avec un faible excès de RO-PCl₂ à -78°C, ce qui se révélait assez compliqué.

La chimie des phosphoramidites.

Après avoir quitté le laboratoire de Letsinger et effectuer un stage post-doctoral dans le laboratoire de Khorana, Caruthers a résolu dans les années 1980 deux problèmes persistants de la synthèse des oligonucléotides : le gonflement des polymères utilisés comme supports solides dans les solvants et l'instabilité du nucléotide intermédiaire phosphite.

En 1981, Caruthers a décrit l'utilisation de support solide à base de silice qui ne gonfle pas dans les solvants organiques (Matteucci et Caruthers 1981). Ce support solide n'est plus actuellement utilisé, il a été remplacé par le « Controlled Pore Glass » (CPG). L'utilisation de ce support solide à base de silice a permis de travailler avec de meilleurs flux de réactifs permettant ainsi d'avoir des temps de rinçage plus courts et surtout il a permis d'augmenter l'efficacité de couplage.

Pour rendre le monochlorure de phosphite de Letsinger moins réactif, Caruther a simplement remplacé le groupe partant chlore par une amine (Matteucci et Caruthers 1981; McBride et Caruthers 1983). Cette modification de groupe partant a énormément changé les propriétés des molécules permettant de les stabiliser et facilitant ainsi leur stockage. Le phosphoramidite pouvait ensuite être activé avec un acide faible (le tétrazole) juste avant d'être couplé. Cette dernière avancée de Caruthers a donc permis de produire des phosphoramidites stables à l'échelle industrielle.

Cycle de synthèse de l'ADN.

Le cycle de synthèse de l'ADN se déroule selon les étapes suivantes ([Figure 23](#)) :

1. Le DMT protégeant l'hydroxyle en position 5' est clivé avec une solution d'acide trichloroacétique à 2% dans du dichlorométhane. Le support est ensuite rincé avec de l'acétonitrile pour éliminer les traces d'acide.
2. Le phosphoramidite est activé avec du tétrazole puis il est couplé avec l'hydroxyle en position 5' déprotégé lors de l'étape précédente.
C'est l'amine secondaire du tétrazole qui joue le rôle d'acide faible. Cette donation de proton conduit à la formation d'un cycle aromatique thermodynamiquement stable. Le pKa de cet acide faible est suffisamment élevé pour ne pas cliver les groupements protecteurs DMT, cependant le pKa ne doit pas être trop élevé pour permettre une bonne activation.

Le mécanisme d'activation a été mis en évidence grâce à la RMN ^{31}P par Berner qui a décrit que la protonation de l'amine est l'étape lente de ce mécanisme, elle est ensuite très rapidement remplacée par le tétrazolure formé (Berner, Mühlegger, et Seliger 1989) ([Figure 22](#)).

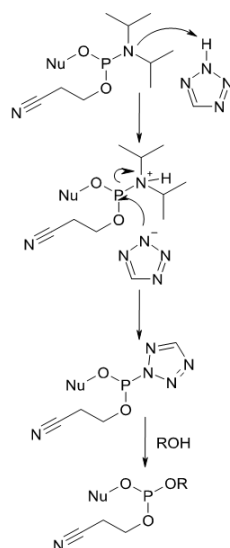


Figure 22 : Mécanisme d'activation du phosphoramidite avec du tétrazole.

3. Après le couplage, le phosphore est oxydé avec une solution à 0,02 M d'iode dans un mélange THF/pyridine/H₂O.
4. Les extrémités de l'oligonucléotide qui n'ont pas réagi présentant donc des groupements hydroxyles libres, sont ensuite « capées » ou coiffées avec un mélange d'anhydride phénoxyacétique et de N-méthyle imidazole.

Le cycle de synthèse que nous utilisons actuellement est le même. Depuis ces dernières avancées la synthèse automatisée des oligonucléotides est devenue très accessible.

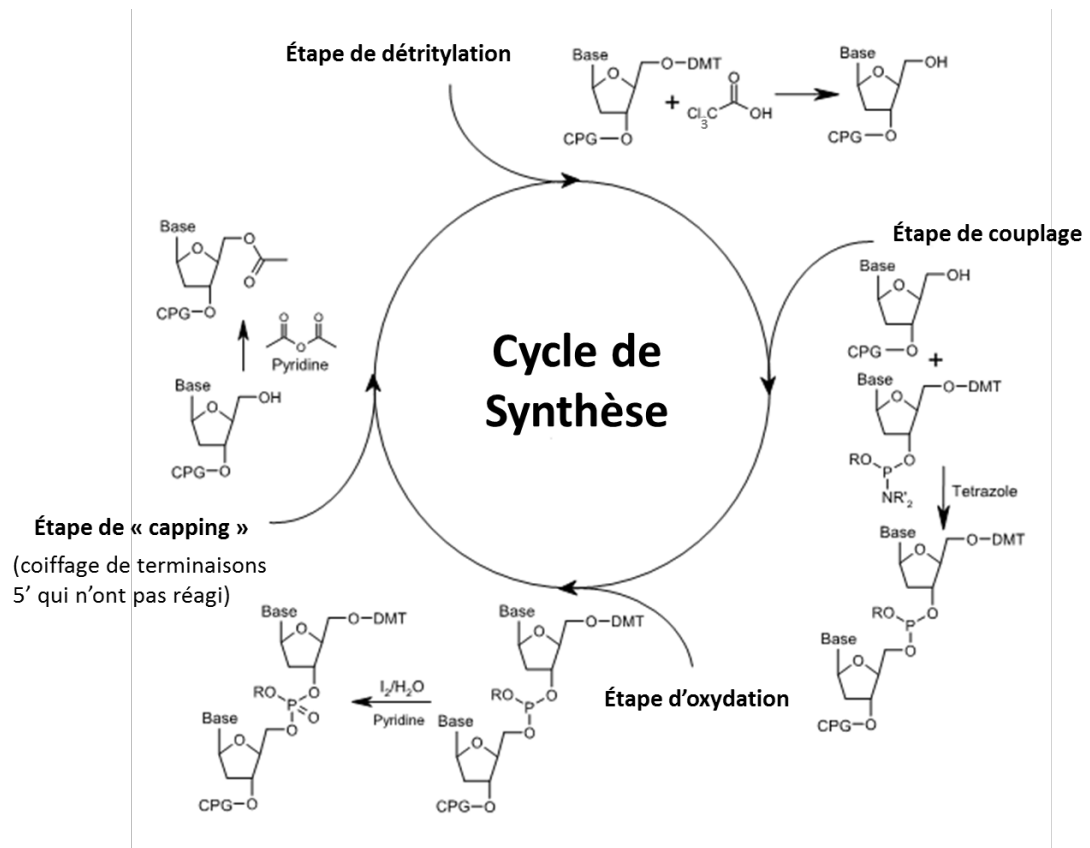


Figure 23 : Cycle de synthèse utilisant la chimie des phosphoramidites.

CHAPITRE 2 : LES ACIDES NUCLEIQUES POUR LA THERAPIE.

A. APPLICATIONS.

En 2011, plus 1700 essais cliniques de thérapie génique étaient répertoriés dans le monde dont plus de 70% concernaient le traitement du cancer. La thérapie génique consiste à introduire chez un patient la copie normale du ou des gènes déficients responsables de la maladie. La thérapie génique peut aussi être employée pour modifier l'expression du ou des gènes délétères impliqués dans une pathologie.

Ces dernières années les oligonucléotides ont largement été utilisés grâce à leur capacité à s'hybrider spécifiquement à une séquence cible. Ils peuvent par exemple être utilisés comme inhibiteurs de gènes pour étudier la fonction et la régulation de gènes spécifiques. Les oligonucléotides peuvent aussi être utilisés comme agents thérapeutiques grâce à leur action modulatrice de gènes.

Un oligonucléotide peut reconnaître et s'hybrider spécifiquement à une séquence cible présente dans une double hélice d'ADN ou dans des simples brins d'ADN ou d'ARN. Lorsque c'est une séquence cible de l'ADN double brin qui est visée, l'oligonucléotide va s'hybrider en formant des liaisons hydrogènes de type « Hoogsteen » ou « Hoogsteen inverse » dans le grand sillon pour se structurer en triple hélice sans pour autant dénaturer les liaisons de type « Watson-Crick ». L'invasion de brin est une autre stratégie qui cible la double hélice d'ADN et qui consiste à utiliser un oligonucléotide qui est capable d'ouvrir la double hélice pour venir s'hybrider à sa séquence complémentaire en formant des liaisons de type « Watson-Crick ». En revanche lorsque les séquences cibles sont portées par des simples brins d'ADN ou d'ARN, l'oligonucléotide va s'hybrider en formant des liaisons hydrogènes de type « Watson-Crick ».

Cette hybridation spécifique de la séquence cible permet aux oligonucléotides d'influer sur la synthèse des protéines soit en bloquant directement leur production, soit en induisant des réponses enzymatiques au niveau cellulaire qui bloquent leur production.

Dans la suite, je décrirai quelques stratégies qui permettent de contrôler la production de protéines et je m'attarderai plus longuement sur la stratégie d'ARN interférence qui est celle que nous avons utilisée pour moduler l'expression génétique, lors de nos travaux.

1. La synthèse de protéines.

Dans la cellule, l'ADN porte l'information génétique. Pour que l'ADN conduise à la production de protéines il faut qu'il soit dans un premier temps transcrit en ARN messager. Ce dernier est ensuite traduit en protéines en suivant le code génétique déterminé par les quatre bases ACGT ([Figure 24](#)).

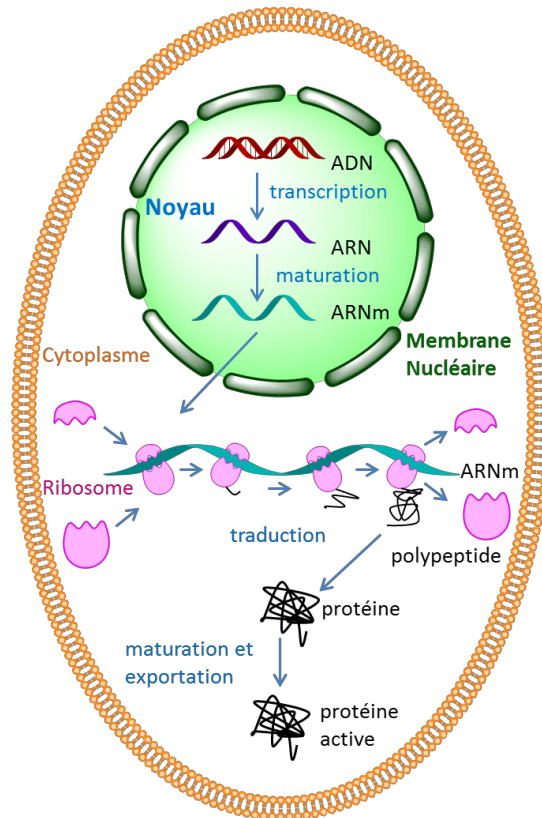


Figure 24 : Schéma de la synthèse des protéines.

La synthèse des protéines se déroule en 3 étapes dans les cellules eucaryotes :

1^{ère} étape : la transcription.

Cette première étape consiste à transcrire l'ADN en ARN pré-messager. La transcription a lieu dans le noyau de la cellule, elle se fait par l'intermédiaire de l'enzyme ARN polymérase de type II.

2^{ème} étape : la maturation de l'ARN pré-messager.

L'ARN pré-messager transcrit est constitué de séquence codantes, les exons, et de séquences non codantes, les introns. La maturation de l'ARN pré-messager commence par l'étape d'épissage, les introns de l'ARN pré-messager vont être éliminés et seuls les exons vont être conservés pour former l'ARN messager (Figure 25). La maturation se complète par l'addition de la coiffe (classiquement 7 méthylguanosine en position 5'), et de la polyadénylation en position 3'.

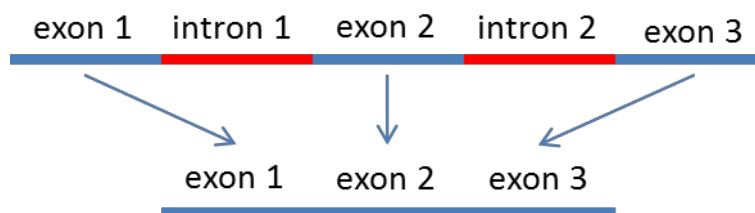


Figure 25 : épissage de l'ARN pré-messager.

3^{ème} étape : la traduction.

L'ARNm mature est transporté dans le cytoplasme pour y être traduit. Lors de cette dernière étape de la synthèse des protéines, c'est la machinerie ribosomique qui assure la traduction. Le ribosome reconnaissant un codon d'initiation et en présence d'ARN de transfert va initier la traduction puis traduire l'ARN messager en une chaîne d'acides aminés qui constitue la protéine. La séquence d'acides aminés de la protéine est dictée par l'enchaînement des codons (combinaison de 3 nucléotides de l'ARN messager codant pour un acide aminé particulier). La fin de la traduction est définie par un codon stop sur la séquence d'ARN messager.

2. *Activité au niveau de l'ADN.*

a) La stratégie anti-gène : les « TFOs ».

L'histoire débute en 1957 quand Felsenfeld et ses collègues montrent qu'il est possible de former une triple hélice d'ADN entre deux chaînes poly(U) et une chaîne poly(A) en présence de magnésium (Felsenfeld, Davies, et Rich 1957) (Figure 26 A). La formation de cette triple hélice s'explique par le fait que le grand sillon de l'ADN peut être accepteur ou donneur de liaison hydrogène ce qui lui permet de former des liaisons de ce type avec un troisième brin d'ADN. Il a ensuite été montré qu'une double hélice contenant seulement des purines sur l'une de ses chaînes peut former une triple hélice avec une autre chaîne contenant seulement des pyrimidines (Morgan et Wells 1968) ou seulement des purines (Beal et Dervan 1991). La liaison hydrogène impliquée dans la triple hélice est différente de la liaison hydrogène de type « Watson-Crick » impliquée dans la formation de la double hélice, on parle de liaison Hydrogène de type « Hoogsteen » ou « Hoogsteen inverse » (Hoogsteen 1959) (Figure 26 B). Il peut se former trois types de triple hélice en fonction de la nature et l'orientation du troisième brin. Il peut se former des triples hélices de type Pyrimidine*Purine-Pyrimidine (Py*Pu-Py), de type Purine*Purine-Pyrimidine (Pu*Pu-Py) et enfin des triples hélices mixtes qui peuvent à la fois former de liaisons de type « Hoogsteen » et « Hoogstenn inverse ».

En 1987, Dervan et Hélène ont montré simultanément qu'un court oligonucléotide peut induire une coupure spécifique de l'ADN lorsqu'il forme avec lui une triple hélice (Moser et Dervan 1987; Doan et al. 1987). A la même période Fresco et Wells ont montré à travers leurs études sur les structures de triples hélices qu'elles peuvent jouer un rôle dans l'expression des gènes (Broitman, Im, et Fresco 1987; Wells et al. 1988).

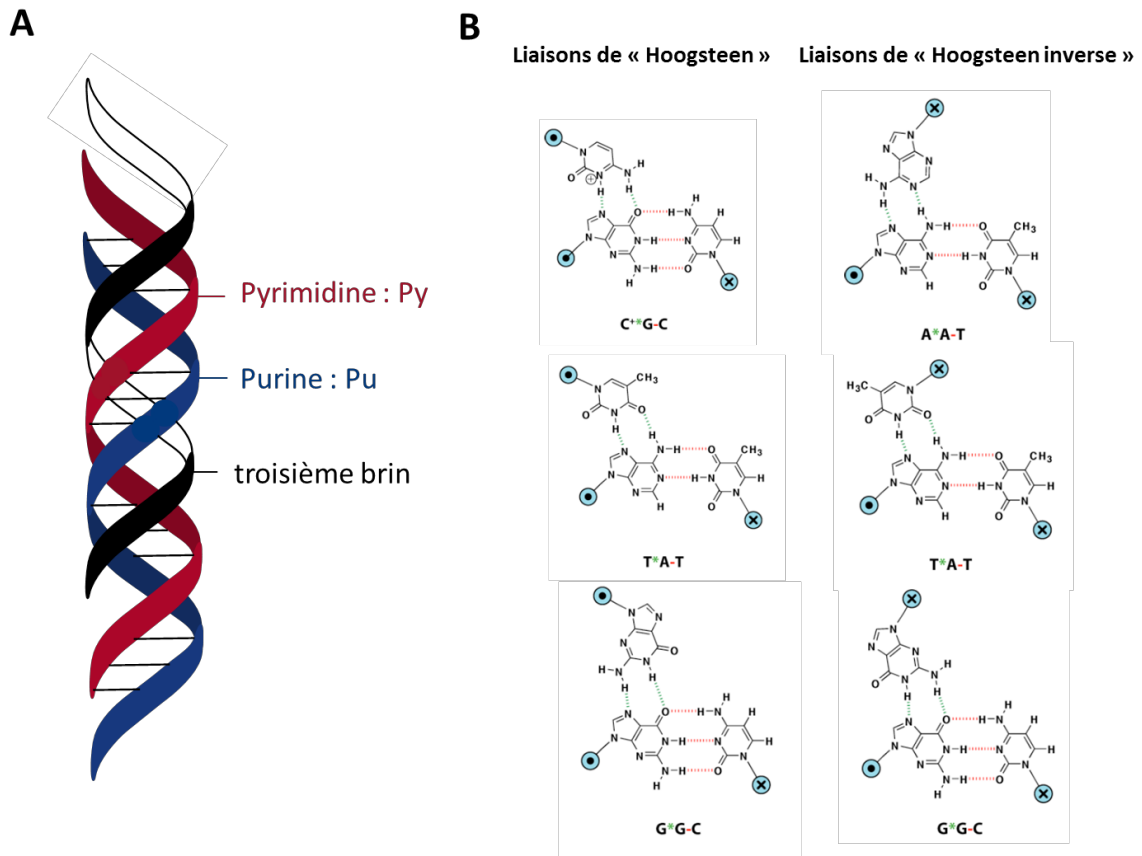


Figure 26 : **A :** Structure d'une triple hélice. Dans cette représentation, le troisième brin (en noir) établit des liaisons hydrogènes avec le brin cible constitué de purines (en bleu) en se logeant parallèlement à ce dernier dans le grand sillon. **B :** Liaisons de type « Hoogsteen » et « Hoogstenn inverse ». Les liaisons hydrogènes de type « Hoogsteen » sont représentées en vert et les liaisons de type « Watson-Crick » en rouge.

La stratégie anti-gène vise à inhiber l'expression d'un gène en bloquant le site d'initiation de la transcription directement dans le noyau. En effet, les triplexes formés ne peuvent pas bloquer l'élongation de la transcription une fois qu'elle a débuté car ils ne sont pas assez stables. Le fait d'agir directement sur l'ADN codant permet d'éviter de cibler les multiples ARNs messager issus de cette ADN.

Il existe des limitations à cette stratégie des TFO (« Triplex Forming Oligonucleotides »), comme la nécessité d'être composé uniquement de bases homopuriques avec une longueur de 12 à 15 bases, ce qui limite le nombre de sites d'hybridation. De plus pour que l'hybridation soit favorisée il faut travailler à un pH inférieur à 6, loin du pH physiologique, pour que les cytosines soient protonées.

b) L'invasion de brin.

La transcription de l'ADN génomique peut également être empêchée en utilisant la stratégie de l'invasion de brin. Cette stratégie consiste à utiliser un oligonucléotide qui est capable d'ouvrir la double hélice d'ADN pour venir s'hybrider à sa séquence complémentaire et ainsi bloquer l'étape de transcription (Figure 27). Ce mécanisme d'invasion de brin n'est possible

que lorsque l'oligonucléotide a une très grande affinité pour sa séquence cible car il est thermodynamiquement très défavorisé. Pour cette stratégie, les oligonucléotides utilisés portent des modifications chimiques qui leur permettent de diminuer les répulsions avec leurs séquences cibles (Demidov et Frank-Kamenetskii 2001; P. E. Nielsen et Egholm 2001; Lohse, Dahl, et Nielsen 1999).

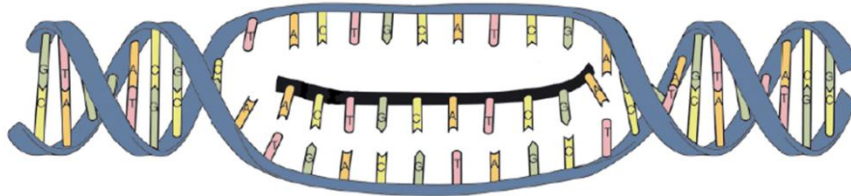


Figure 27 : Invasion de la double hélice d'ADN (en bleu) par un oligonucléotide (en noir).

3. *Activité au niveau de l'ARN.*

a) *Stratégie Antisens.*

La stratégie de thérapie antisens utilise des oligonucléotides ADN qui s'hybrident à leurs séquences complémentaires d'ARN messenger pour induire ensuite le clivage de ces derniers grâce à la Ribonuclease-H, une enzyme qui dégrade l'ARN des hétéroduplexes ADN-ARN. Le clivage de l'ARN messenger induit l'inhibition du gène ciblé (Figure 28) et abolit la production de la protéine correspondante.

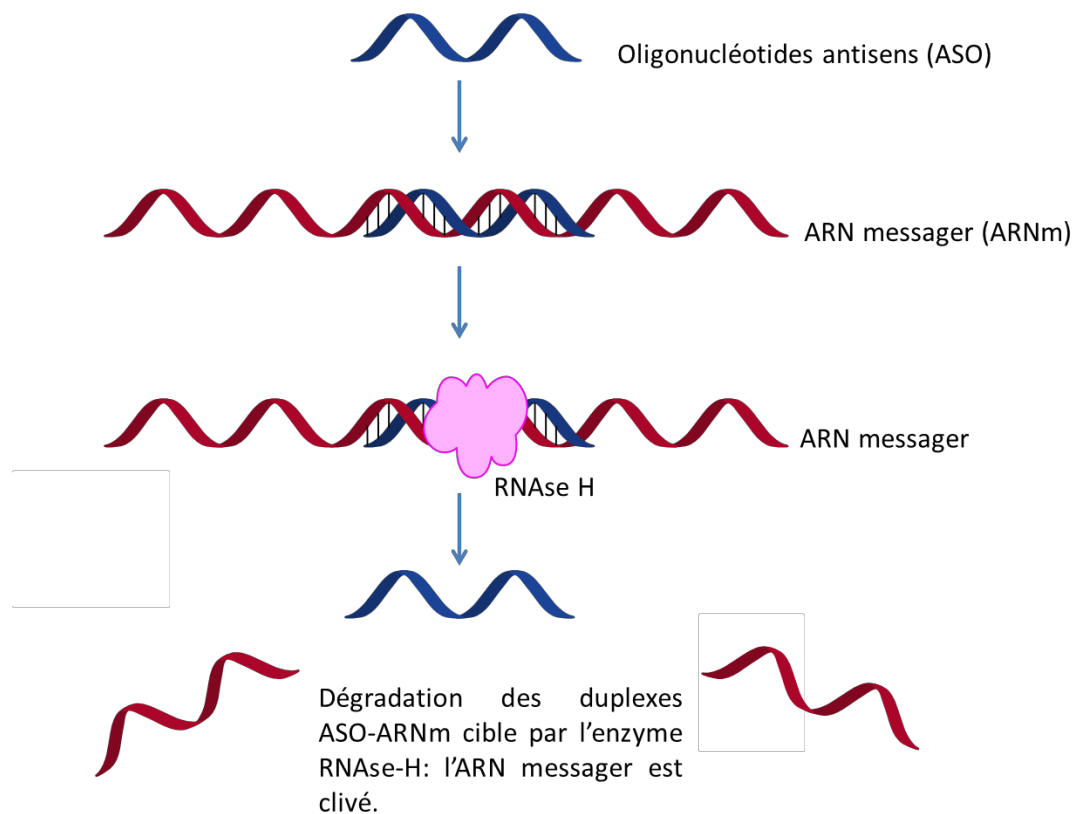


Figure 28 : Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens. L'oligonucléotide antisens modifié vient s'hybrider sur sa séquence cible d'ARN messenger. Ensuite l'hétéroduplexe ADN-ARN formé est reconnu par l'enzyme Ribonucléase-H pour être dégradé. L'ARN messenger est ainsi clivé.

Les premiers résultats montrant l'intérêt des oligonucléotides antisens furent obtenus en 1978 par Zamecnik et Stephenson. Ils montrèrent qu'un oligonucléotide ADN 13-mère complémentaire avec sa séquence cible du virus du sarcome de Rous inhibe *in vitro* la réplication du virus ainsi que la traduction de l'ARN messenger en protéines. Cette découverte fût le point de départ des recherches sur les oligonucléotides antisens (Zamecnik et Stephenson 1978). Zamecnik et Stephenson ont décrit l'utilisation de modifications chimiques en position 3' et 5' qui permettaient aux oligonucléotides de ne pas être dégradés par les nucléases cellulaires, améliorant ainsi leur activité. Ils ont également montré que lorsque l'oligonucléotide antisens comporte 3 mésappariements, il est inactif. Ce résultat montre la spécificité des oligonucléotides antisens.

Dix années plus tard, l'introduction de liens phosphorothioates (Figure 29) entre les nucléotides par Matsukura dans une séquence ciblant le VIH et l'introduction en 1990 des nucléotides 2'-O-Méthyles aux extrémités 3' et 5' par Agrawal (Figure 30), ont permis d'augmenter considérablement la stabilité des oligonucléotides tout en permettant le clivage de l'ARN des hétéroduplexes ARN-ADN antisens par la Ribonucléase-H (RNaseH). (Matsukura et al. 1987; Agrawal et al. 1990).

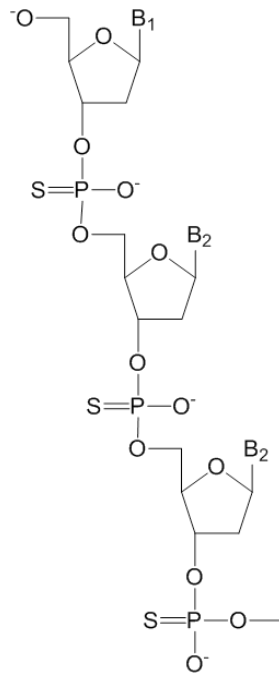


Figure 29 : Liens inter-nucleotides phosphorothioates.

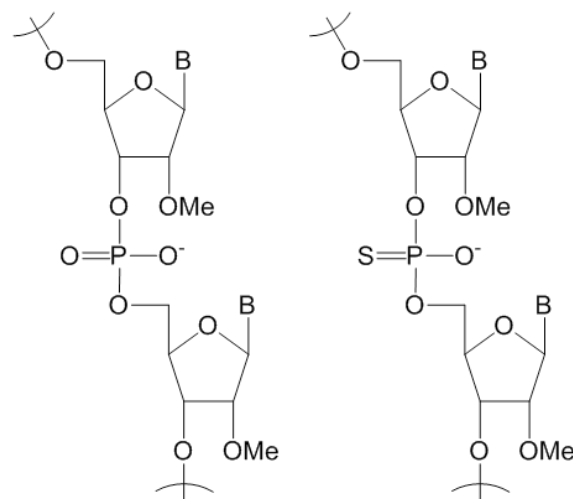


Figure 30 : Nucléotides 2'-O-Méthyl (2'-O-Me).

Quelques oligonucléotides antisens candidats ont pu passer les premières étapes de développement d'un médicament mais seulement un, le Fomivisirsén a été enregistré comme médicament actif pour soigner le cytomegalovirus induit par une rétinite chez les patients souffrant du VIH. Cet oligonucléotide antisens de 21-mère a été injecté directement dans l'œil. Les avantages de ce type d'administration directement dans l'humeur vitrée sont que les doses utilisées sont très faibles, et que les effets secondaires sont réduits car l'administration ne se fait pas par voie systémique. C'est donc 20 ans après la découverte de cette thérapie « antisens » que le premier médicament issu de cette découverte a été mis sur le marché.

Malgré les faibles effets secondaires des oligonucléotides antisens phosphorothioates, un problème existe : leurs structures induisent une grande toxicité séquence dépendante. Les effets constatés sont l'augmentation du temps de coagulation et l'activation d'une réponse immunitaire inflammatoire. Ces oligonucléotides antisens phosphorothioates peuvent aussi conduire selon leurs séquences à une très forte réponse immunitaire induite par leurs interactions avec les Toll-like récepteurs (TLRs), ils peuvent aussi directement se lier avec les protéines ce qui engendre des effets indésirables.

Jusqu'à récemment quelques entreprises travaillaient encore sur le développement d'oligonucléotides antisens. C'est le cas de Genta avec leur médicament candidat l'Oblimersen qui présente un potentiel anticancéreux. Ce médicament cible la séquence de l'ARN messenger codant pour le gène anti-apoptotique bcl-2 impliqué dans le lymphome B2 (BCL-2). Ces protéines anti-apoptotiques sont souvent sur-exprimées dans la plupart des cancers. Pour l'Oblimersen, 45 essais cliniques ont été réalisés sur environ 1 000 patients pour conclure à sa faible efficacité pour le traitement des mélanomes et son inefficacité pour le traitement des myélomes. Ce développement a coûté environ 480 millions USD à Genta et Aventis.

b) La stratégie du saut d'exon.

Une autre génération d'oligonucléotide thérapeutique a ensuite été développée : les « splice-switching oligonucleotide » (SSOs). Ils sont utilisés pour la stratégie du saut d'exon qui permet d'agir sur la production de protéines au niveau de l'étape d'épissage de l'ARN pré-messenger (Kole et Sazani 2001). Les SSOs, contrairement aux oligonucléotides antisens ne sont ni reconnues par la ribonucléase H, ni par le complexe RISC (« RNA-induced silencing complexe »). Le saut d'exon consiste à forcer la machinerie d'épissage à exciser comme pour les introns de l'ARN pré-messenger un exon déficient responsable de la non fonctionnalité d'une protéine. La preuve de concept a été validée initialement dans le cas de la maladie de Duchenne pour laquelle le saut d'exon permet de générer certes une dystrophine tronquée mais fonctionnelle. Les SSOs ont plusieurs applications, ils peuvent servir à réparer l'ARN, ils peuvent rétablir la production de protéines, ils peuvent aussi servir à générer de nouvelles protéines dans le but de soigner des maladies qui induisent la formation de protéines non fonctionnelles ([Figure 31](#)).

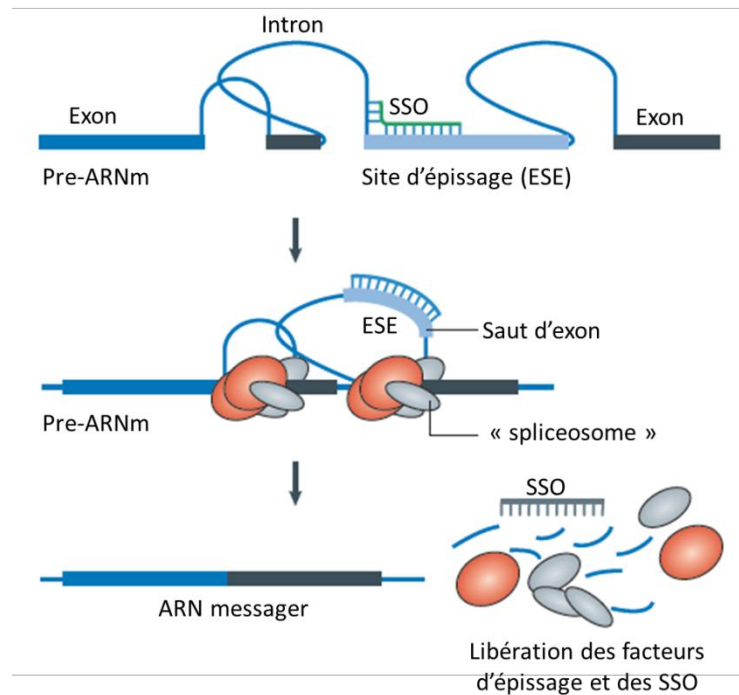


Figure 31 : Saut d'exon et « splice-switching oligonucleotides » (SSOs). Un oligonucléotide modifié cible le site d'épissage ESE (« exonic splicing enhancer ») de l'ARN pré-messager pour que l'exon ciblé ne soit pas pris en charge par la machinerie de l'épissage (« spliceosome »), c'est le mécanisme du saut d'exon. En conséquence, l'ARN messager épissé peut coder pour une nouvelle protéine ou dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne peut restaurer la fonctionnalité des protéines. Ces résultats ne peuvent pas être obtenus avec des oligonucléotides antisens ou des siRNAs qui ont pour but de détruire l'ARN cible.

c) Les aptamères.

Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques qui ont une affinité spécifique pour leurs cibles. Ils agissent comme des ligands et leurs cibles peuvent être des protéines ou des peptides. Leur mode d'action est comparé à celui des anticorps et leur structure est globulaire comme celle des ARNs de transfert.

Généralement les aptamères ont des masses moléculaires comprises entre celles d'un petit peptide et celles d'un fragment de mono chaîne d'anticorps (1 kDa-25 kDa) (Hicke et Stephens 2000). Récemment, les aptamères ont commencé à être utilisés en essais cliniques (Ni et al. 2011). Ces petites molécules, le plus souvent d'ARN, forment des structures secondaires ou tertiaires capables d'interagir spécifiquement avec des protéines. Ils ont l'avantage de ne pas être immunogènes.

La sélection des aptamères en fonction de leur cible se fait selon la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) (Figure 32).

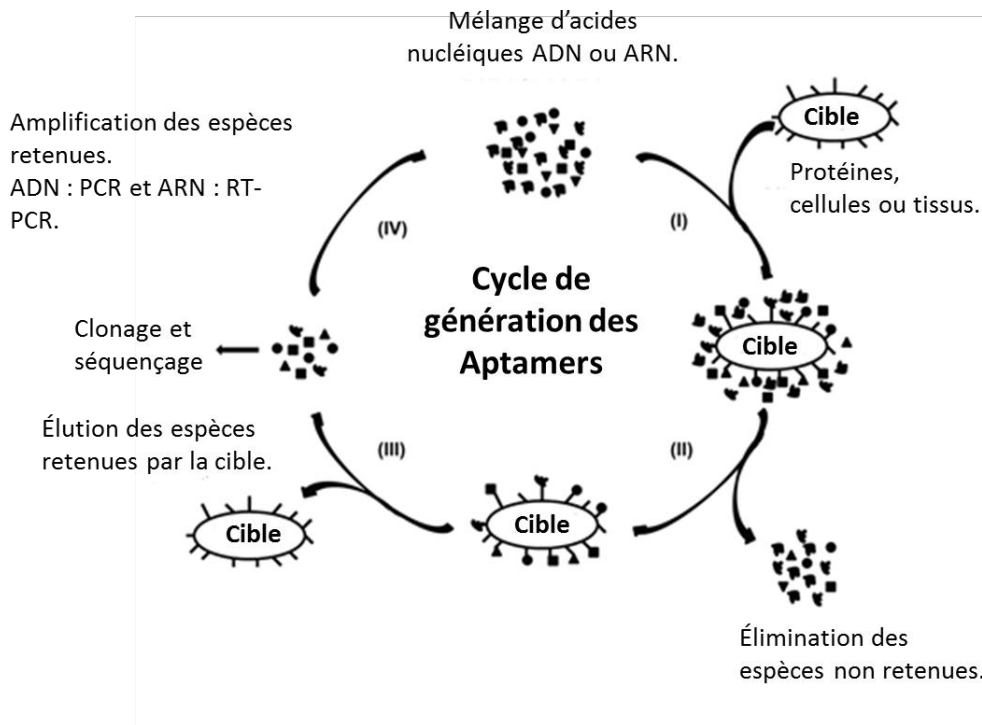


Figure 32 : Méthode de sélection SELEX des aptamères. I) Le mélange d'aptamères est incubé avec une cible pour l'étape de ligation. II) Un cycle de lavage de la cible est réalisé pour éliminer les aptamères non fixés. III) Les aptamères qui étaient liés à leur cible sont ensuite élués. IV) Les aptamères sélectionnés sont ensuite amplifiés par PCR. Les étapes I à IV sont répétées plusieurs fois pour enrichir la composition finale en aptamères désirés. Après le dernier cycle, les aptamères retenus sont clonés et séquencés pour déterminer leur séquence.

Depuis la découverte des aptamères au début des années 1990, beaucoup d'efforts ont été faits pour valider leur potentiel en essais cliniques. Par exemple, des essais cliniques utilisent les aptamères comme inhibiteurs du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou de la thrombine. En 2004, les premiers aptamères thérapeutiques pour le traitement de la dégénérescence maculaire ont été approuvés par l'agence américaine FDA (Food and Drug Agency). Les aptamères sont faciles à synthétiser et à modifier ce qui en fait de bons candidats comme médicaments. Depuis, d'autres aptamères sont en cours d'évaluation dans plusieurs essais cliniques ([Tableau 1](#)).

Tableau 1 : Aptamères actuellement en développement clinique.

Name	Nucleotide	Target	Condition	Phase	Company
Pegaptanib	RNA	VEGF	Macular Degeneration	FDA approved	Pfizer/Eyetech
AS1411	DNA	Nucleolin	Acute Myeloid Leukemia	Phase II	Antisoma Research
REG1 (RB006/ RB007)	RNA	Coagulation Factor IX	Coronary Artery Disease	Phase II	Regado Biosciences
ARC1779	DNA	vWF	Purpura, Thrombotic Thrombocytopenic	Phase II	Archemix
NU172	DNA	Thrombin	Heart Disease	Phase II	ARCA biopharma
NOX-A12	RNA	CXCL12	Hematopoietic Stem Cell Transplantation	Phase I	NOXXON Pharma AG
NOX-E36	RNA	CCL2	Type 2 Diabetes Mellitus	Phase I	NOXXON Pharma AG
ARC1905	RNA	C5	Age-Related Macular Degeneration	Phase I	Ophthotech
E10030	DNA	PDGF	Age-Related Macular Degeneration	Phase II	Ophthotech

4. *Le mécanisme d'ARN interférence.*

a) Les origines.

L'ARN interférence est un mécanisme naturel qui inhibe l'expression des gènes de manière sélective et spécifique. Depuis cette découverte il y a une dizaine d'années, le potentiel de ce mécanisme devrait révolutionner la médecine et a créé l'engouement des industriels pharmaceutiques et des compagnies de biotechnologies (Figure 33).

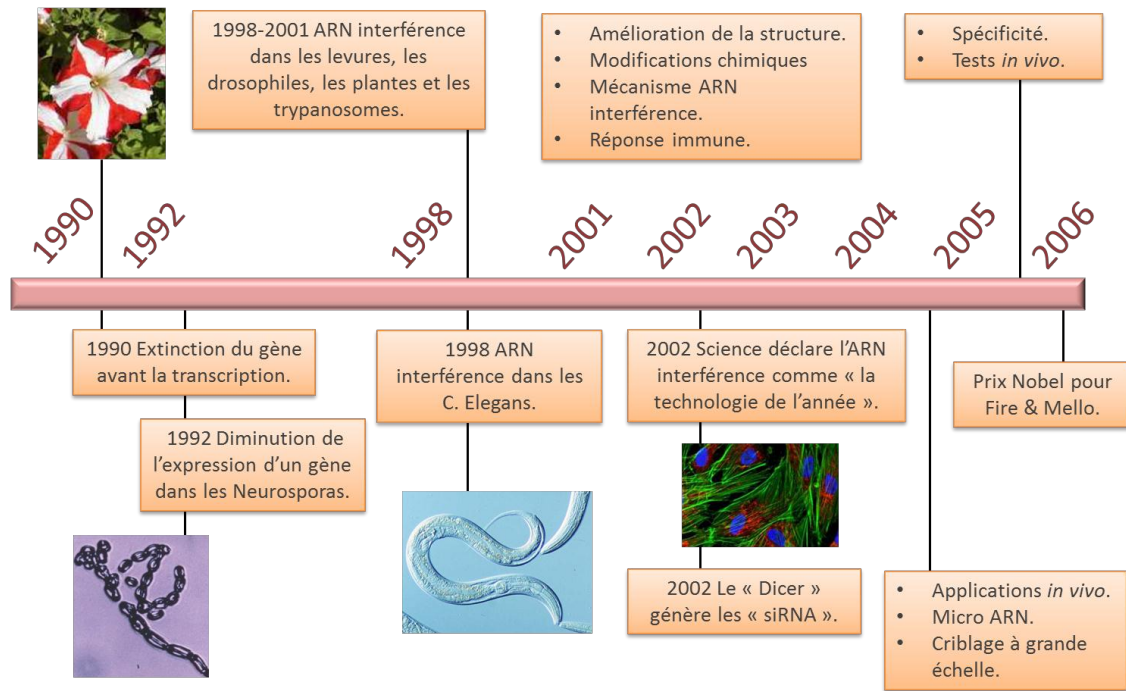


Figure 33 : Les origines de l'ARN interférence.

En 1990, Napoli et Jorgensen furent les premiers à décrire un phénomène de type ARN interférence (Napoli, Lemieux, et Jorgensen 1990). Lors d'une expérience qui visait à obtenir des pétunias violets, Napoli and Jorgensen ont tentés de sur-exprimer le gène codant pour la production de la chalcone synthétase mais ils ont obtenu le résultat inverse : les pétunias obtenus étaient blancs. L'hypothèse était que les transgènes introduit étaient co-supresseur du gène endogène de la chalcone synthétase.

En 1992, Romano and Macino ont décrit le même phénomène dans le *Neurospora crassa*, un champignon tropical. Ils ont montré que l'introduction d'une séquence d'ARN homologue provoque « l'étouffement » du gène endogène. (Romano et Macino 1992).

Le premier phénomène d'ARN interférence observé chez l'animal fut décrit par Guo et Kemphues en 1995. Ils ont observé une dégradation de l'ARN messenger par-1 dans les vers ronds (nématodes) *Caenorhabditis elegans* après avoir introduit de l'ARN sens et antisens (Guo et Kemphues 1995). A cette époque l'utilisation d'oligonucléotides antisens était l'un des moyens les plus attractifs pour inhiber l'expression d'un gène. Guo et ses collègues furent surpris de constater lors de leur expérience contrôle, que l'utilisation du brin d'ARN sens portant la séquence par-1, qui ne devait pas s'hybrider avec son transcrite endogène induisait aussi une dégradation. Cette constatation obligeait les chercheurs à revoir la théorie antisens.

b) Elucidation de l'extinction des gènes.

En 1998, Fire et Mello ont publié le premier article qui donnait les explications sur l'extinction des gènes endogènes précédemment décrites (Fire et al. 1998). Travaillant eux aussi avec des *C. elegans* ils ont montré que l'extinction des gènes n'était pas provoquée par de l'ARN simple brin mais par de l'ARN double brin. Fire et ses collègues ont montré que

contrairement à ce que prétendaient Guo et Kempfues, l'extinction du gène cible par le brin ARN sens devait être due à la contamination des simples brins ARNs par des doubles brins provenant de l'activité de l'enzyme ARN bactériophage polymérase. Ils ont également montré que l'activité des simples brins ARNs sens ou antisens était 10 à 100 fois moins importante que l'activité des ARNs doubles brins.

c) Identification de l'intermédiaire d'extinction.

Lorsqu'un double brin d'ARN est injecté dans des vers ronds, il en résulte une extinction systémique ce qui signifie que l'extinction se fait par le biais d'un intermédiaire stable. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'extinction du gène est héréditaire chez *C. Elegans* (Grishok, Tabara, et Mello 2000; Voinnet et Baulcombe 1997). L'existence de ces intermédiaires stables a été montrée chez les plantes par les virologistes Hamilton et Baulcombe (Hamilton et Baulcombe 1999). L'hypothèse était qu'il fallait dérouler le double brin d'ARN pour permettre au brin antisens de s'hybrider avec l'ARN messager, mais la présence du brin antisens entier ne fut jamais détectée. Ces constatations ont menées Hamilton et Baulcombe à chercher des formes plus courtes de l'ARN antisens provenant du double brin d'ARN introduit. Ils ont émis l'hypothèse que le brin antisens devait probablement servir de guide, en se liant à l'ARN messager pour provoquer sa destruction. Hamilton et Baulcombe ont détecté de l'ARN antisens d'environ 25 nucléotides de longueur et ils ont conclu que cette taille d'ARN était suffisante pour induire spécifiquement l'extinction du gène cible.

L'année suivante, en 1998, deux autres équipes ont identifié l'intermédiaire d'extinction dans des extraits de cellules de *Drosophila* (Zamore et al. 2000; Elbashir, Lendeckel, et Tuschl 2001). Ils ont montré que leurs purifications donnaient toujours des ARNs de 21-23 nucléotides, laissant supposer que les doubles brins d'ARN étaient réduits en de plus petits intermédiaires : les petits ARNs interférents (siRNA : small interfering RNA) capables de s'associer à leurs ARNs messager cibles, pour induire leurs clivages.

Tuschl et ses collègues ont démontré que la taille effective pour qu'un double brin d'ARN induise le mécanisme d'ARN interférence est de 21-23 paires de bases. Ils ont incubé des extraits de cellules de Drosophiles en présence d'ARNs synthétiques de 21-22 paires de bases ciblant le gène de la luciférase. Ces petits ARNs synthétiques ont été capables de conduire au clivage de l'ARN messager qui était ciblé. Les siRNAs avec 2-3 nucléotides non appariés à l'extrémités 3' de chaque brin furent plus efficaces pour réduire les quantités d'ARN messager cible que les siRNAs avec des extrémités 3' franches. Tuschl et ses collègues ont également montré que le clivage de l'ARN cible s'effectue au niveau des paires de bases 11-12 du siRNA.

En 2001, Elbashir et ses collègues montrent que des petits ARNs interférents synthétiques peuvent éteindre les gènes endogènes ciblés lorsqu'ils sont introduits par transfection dans des cellules mammifères (Elbashir et al. 2001). Il a été montré que l'introduction d'un long double brin d'ARN dans des cellules mammifères induit une réponse interféron qui inhibe la traduction et induit la perte de spécificité du mécanisme ARN interférence.

d) Découverte de DICER et des endonucléases double brin.

Pour déterminer si les enzymes responsables du clivage des doubles brins ARNs en siRNA sont les mêmes que celles responsables du clivage de l'ARN messenger cible, Bernstein et ses collègues ont travaillé avec des extraits de cellules de *Drosophiles* pour essayer de séparer ces deux enzymes (Bernstein et al. 2001). Ils ont montré que les deux enzymes impliquées pouvaient être isolées simplement par ultra-centrifugation. Ainsi, l'enzyme responsable du clivage de l'ARN messenger pouvait être isolée par ultracentrifugation tandis que l'enzyme qui clive les double brin d'ARN en petits siRNAs restait dans le surnageant. Ils ont donc réussi à isoler les deux enzymes impliquées dans le mécanisme d'ARN interférence et ils ont appelé le complexe responsable du clivage de l'ARN messenger : « RNA-induced silencing complex ».

Hannon et ses collègues ont montré que l'enzyme RNase de type III était responsable du clivage des doubles brins d'ARNs en petits siRNAs. Cette enzyme a été nommée DICER. Elle est présente dans tout les organismes où il a été observé une activité d'ARN interférence (Sontheimer 2005). Après identification de l'enzyme DICER, les recherches ont portées sur l'identification des composants du complexe RISC en particulier sur l'enzyme responsable du clivage de l'ARN messenger.

e) Identification du « slicer » ou trancheur.

Pour purifier le complexe RISC, Tushl et ses collègues ont utilisé des extraits de cellules humaines HeLa. Pour cela, ils ont conjugué en position 3' de leur siRNA une biotine qui a permis de co-immunoprécipiter les complexes de protéines associés au siRNA pour ensuite les purifier en fonction de leurs tailles et de leurs masses moléculaires (Martinez et al. 2002). Ils ont identifié deux protéines de 100 kDa, Argonaute 1 et Argonaute 2 (Ago1 et Ago2).

En 2004, deux groupes ont identifié le « slicer » ou trancheur. Le premier groupe dirigé par Joshua-Tor a réussi à cristalliser une protéine Argonaute de archaébactérie *Pyrococcus furiosus* et ils ont montré que cette protéine comportait un site de clivage de composition similaire à celui de la RNase-H (Song et al. 2004). Le deuxième groupe dirigé par Hannon a marqué les protéines Argonautes 1 à 4 puis a immunoprécipité chaque complexe Ago/ARN issus de cellules humaine 293-T (Liu et al. 2004). Hannon et ses collègues ont montré que seul le complexe immunoprécipité Ago 2 avait une aptitude de clivage tandis que les autres argonautes montraient seulement une aptitude d'accrochage. Ce résultat indique que c'est bien Ago2 qui est responsable du clivage de l'ARN messenger. Il restait encore à comprendre comment le siRNA était pris en charge par le complexe RISC.

En 2005, deux groupes indépendants, l'un dirigé par Wang et l'autre par Matranga ont démontré que la séparation des deux brins d'un siRNA n'était pas le fait d'une enzyme hélicase mais que c'est Ago2 lui-même qui sépare le brin sens du siRNA pour que le brin antisens soit pris en charge par RISC (Matranga et al. 2005; Rand et al. 2005). Ils ont également montré que le brin guide ou brin antisens (brin du duplexe siRNA qui porte l'activité biologique, l'autre brin sens ou passager n'a aucune activité biologique) était reconnu par le complexe RISC.

En 2003, Jayanesa et ses collègues ont comparé les propriétés thermodynamiques des siRNAs actifs et non-actifs (Khvorova, Reynolds, et Jayasena 2003). Leurs résultats ont montré que la région 5' du brin antisens actif est thermodynamiquement moins stable que la région 5' du brin sens, indiquant ainsi que RISC discrimine le brin antisens sur la base d'une plus faible stabilité de la région 5'.

f) Détermination de la structure minimale du complexe RISC.

En 2005, Gregory et ses collègues ont identifié la structure du complexe RISC à 500 kDa en caractérisant les protéines co-purifiées avec le DICER Humain (Gregory et al. 2005). Deux protéines furent découvertes comme associées au DICER, Ago2 et TRBP (HIV transactivating response RNA-binding protein). La même équipe avait précédemment montré que la protéine TRBP est nécessaire pour que Ago 2 incorpore le siRNA lié au DICER (Chendrimada et al. 2005). C'est donc grâce à ce complexe ternaire que les petits ARNs interférents ou les doubles brins d'ARNs peuvent induire le mécanisme d'ARN interférence.

g) Activité ARN interférence et traduction des ARNs messenger.

L'hypothèse que l'activité du complexe RISC va de paire avec la traduction est intéressante si on considère que RISC est capable d'analyser tout les ARNs messenger traduits pour permettre l'hybridation des siRNAs. Pour étayer cette hypothèse, il a été montré qu'un ARN messenger « dormant » de *D. melanogaster* était insensible au clivage induit par le mécanisme d'ARN interférence (Kennerdell, Yamaguchi, et Carthew 2002). Une autre hypothèse était que des protéines se liaient à l'ARN messenger non traduit pour bloquer à la fois le mécanisme d'ARN interférence et la traduction .

Sen et ses collègues ont montré que l'activité de RISC et des siRNAs est indépendante de la traduction ou non de l'ARN messenger. Ils ont obtenu ces résultats grâce à des essais basés sur la traduction de l'ARN messenger codant pour les protéines IRP1 et IRP2 (protéines impliquées dans la régulation du fer) (Sen, Wehrman, et Blau 2005; Gu et Rossi 2005).

h) Localisation d'Argonaute 2.

Les cellules eucaryotes possèdent deux moyens pour réguler le renouvellement des ARNs messenger (R. Parker & H. Song 2004). Le premier utilise les exonucléases 3'-5' pour dégrader les ARNs messenger (Anderson et Parker 1998). Le deuxième se passe dans le cytoplasme au niveau des « Center Processing Bodies » ou « p-bodies » (Cougot et al. 2004; Sheth & R. Parker 2003). En 2005, Blau et ses collègue ont montré que le complexe RISC/Ago2 se situe dans le cytoplasme au niveau des « P-bodies » (Sen et Blau 2005). Une autre équipe a aussi démontré que les protéines Argonautes 2 étaient localisées dans les centres de dégradation « p-bodies » en réduisant la quantité de la protéine GW182. Cette protéine entre en jeu dans la formation de corps cytoplasmiques (P-bodies). Ils ont constaté que la réduction des centres de dégradation induit une diminution de la dégradation des ARNs messenger par la voie ARN interférence (Jakymiw et al. 2005).

Les principales étapes du mécanisme d'ARN interférence sont décrites dans le schéma suivant (Figure 34).

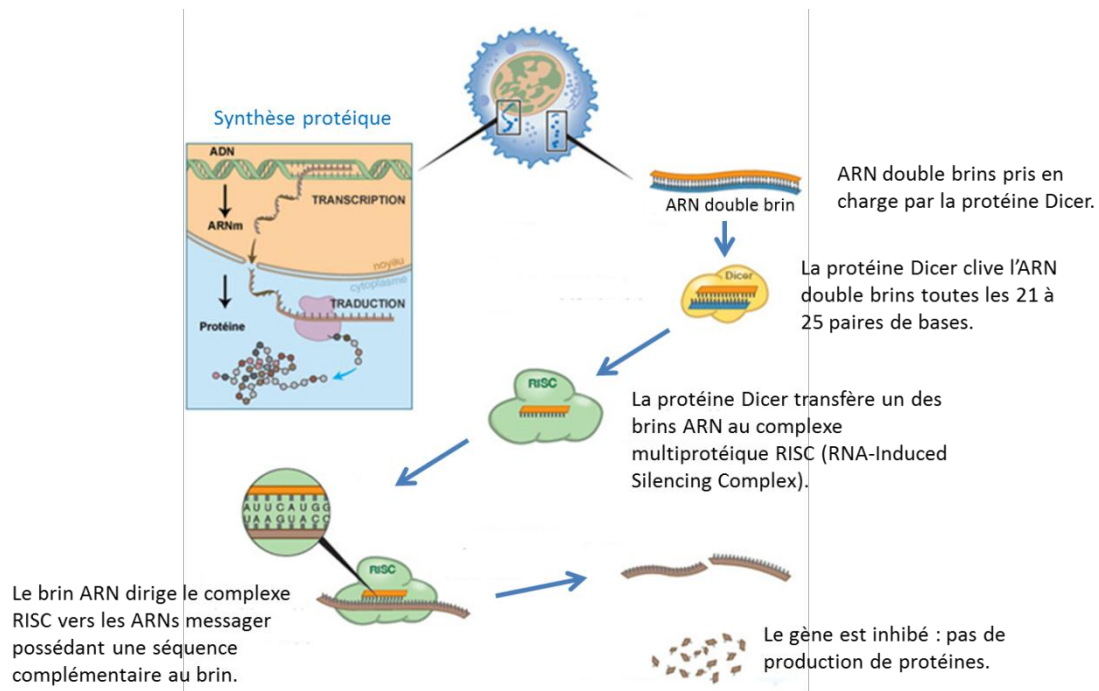


Figure 34 : Mécanisme de l'ARN interférence.

i) Les petits ARNs interférents : « siRNA ».

Les petits ARNs interférents ont été les premiers ARNs utilisés pour induire l'extinction des gènes par la voie ARN interférence. Ces petits doubles brins d'ARNs sont directement pris en charge par le complexe RISC dans lequel le brin antisens (ou brin guide) est reconnu pour ensuite induire le clivage de son ARN messager complémentaire. Une fois l'ARN messager dégradé le complexe RISC associé au brin antisens peut répéter un nouveau cycle de reconnaissance-clivage (Figure 35). L'efficacité du mécanisme d'ARN interférence permet l'extinction du gène cible *in vitro* en utilisant des quantités en siRNA de l'ordre de la picomole. Cependant les siRNAs présentent des limitations pour leur utilisation *in vivo*. En effet, ils sont sensibles aux nucléases et doivent donc être protégés avant d'être distribués dans les tissus cibles. Les siRNAs doivent aussi être administrés fréquemment puisqu'ils ne sont pas produits de façon endogène et que leur pharmacocinétique montre qu'ils sont éliminés rapidement.

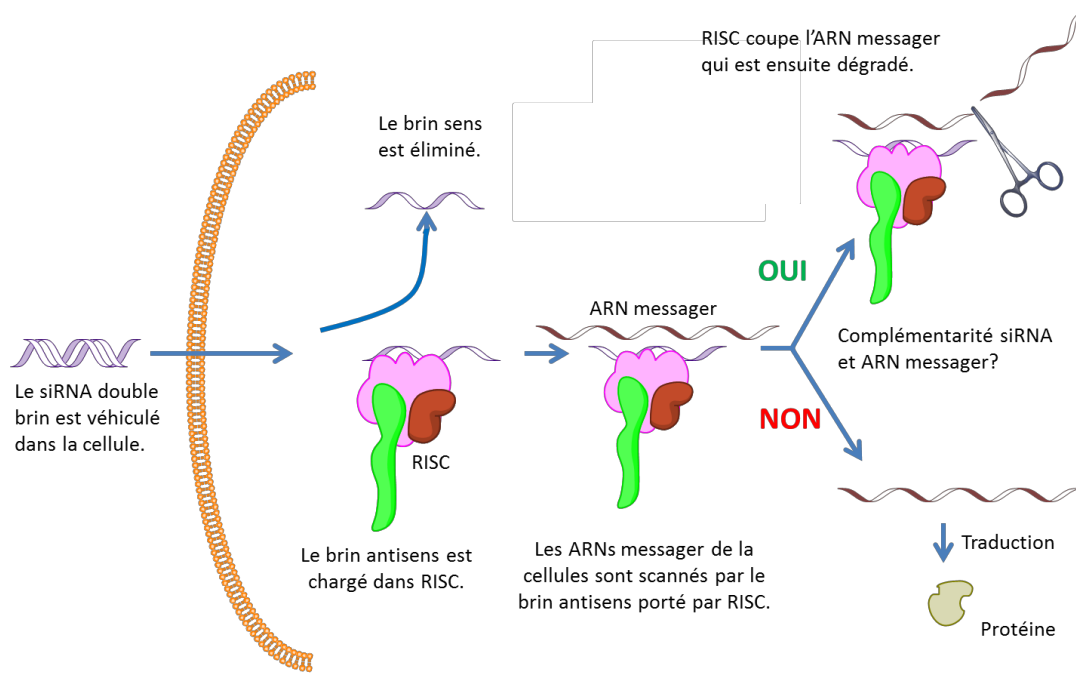


Figure 35 : Schéma du mécanisme d'ARN interférence induit par les siRNAs.

j) Les ARNs en épingle à cheveux : les shRNAs.

Les ARNs en épingle à cheveux (« Short Hairpin RNAs ») ont été développés comme alternative aux siRNAs pour obtenir une extinction de gène durable (Yu, DeRuiter, et Turner 2002). Le shRNA est transcrit dans le noyau à partir d'un vecteur d'expression sous la forme d'un ARN simple brin qui se structure en duplexe reliant les brins sens et antisens par une boucle simple brin (Figure 36). Le shRNA est ensuite découpé en différentes étapes pour être finalement pris en charge par le complexe RISC dans le cytoplasme. Il y a ensuite dégradation de l'ARN messager cible lorsqu'il y a complémentarité avec le siRNA du complexe RISC. Certaines caractéristiques intrinsèques du shRNA sont différentes de celles du siRNA (Rao et al. 2009).

Seulement 1% des duplexes siRNAs sont encore présents dans les cellules 48 h après leur transfection. Ils sont rapidement dégradés et ne se renouvellent pas dans les cellules. Au contraire, les shRNAs sont en perpétuelle production *in situ* dans les cellules hôtes ce qui induit une extinction de gène plus longue comparativement aux siRNAs. Cependant la stratégie shRNA pose de sérieux problèmes de sécurité du fait de l'utilisation de vecteurs d'expression qui peuvent être d'origine virale.

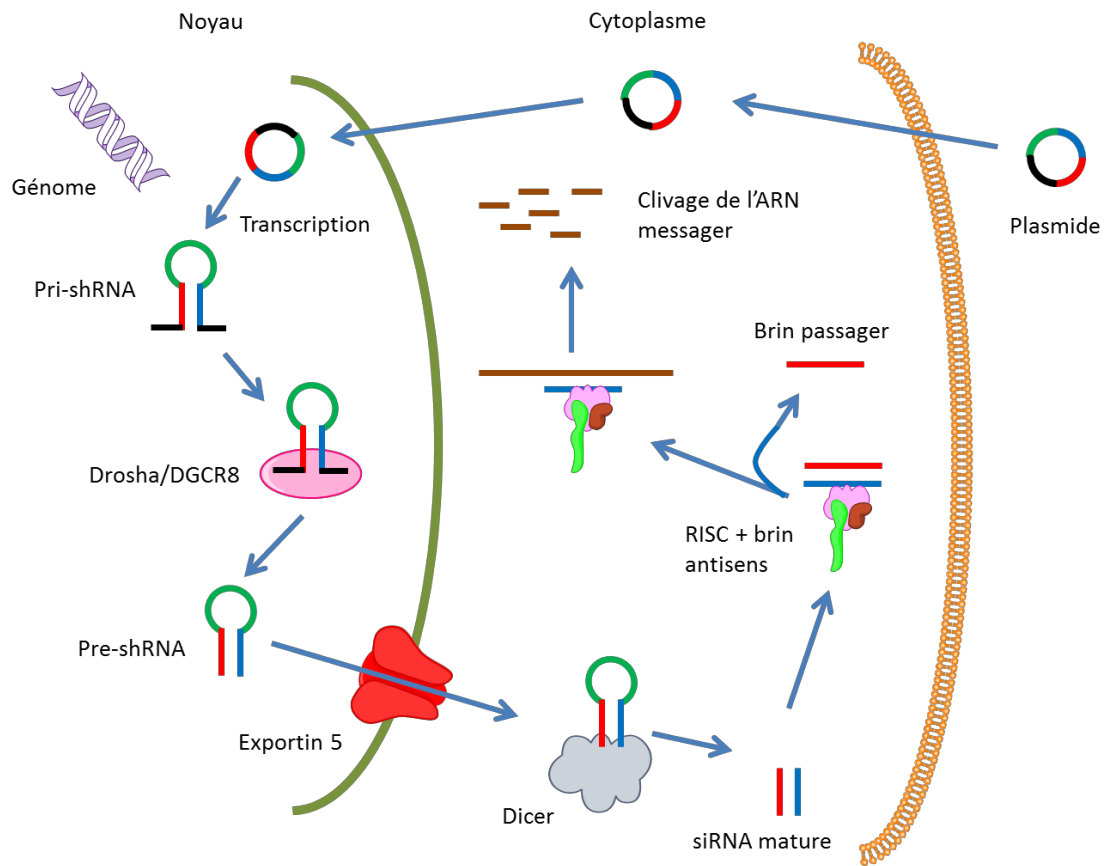


Figure 36 : Mécanisme d'ARN interférence par la voie shRNA.

Après que le vecteur de l'expression des shRNAs soit entré dans le cytoplasme, ce même vecteur doit être transporté dans le noyau pour la transcription. Le premier transcrit pri-shRNA est obtenu de la même façon qu'un microRNA (voir paragraphe suivant). Il est ensuite pris en charge par le complexe Drosha (enzyme RNase de type III) pour former les pre-shRNAs. Ces pre-shRNAs sont ensuite transportés dans le cytoplasme grâce à l'Exportine 5 (protéine d'export nucléaire), ils sont ensuite pris en charge par le DICER qui les transforme en shRNAs matures. Les shRNAs matures sont ensuite associés avec la protéine argonaute contenue par RISC pour agir en tant qu'ARN interférent en clivant les ARNs messenger ce qui conduit à leur suppression traductionnelle par les « p-bodies ».

k) Les micro-ARNs : microRNAs (miRNAs).

Les microRNAs sont des petits ARNs non codants indispensables pour réguler les fonctions physiologiques et pathologiques cellulaires (croissance, apoptose, prolifération...). Les microRNAs sont initialement transcrits dans le noyau sous la forme de longs précurseurs, les « pri-miRNAs », issus de séquences contenues dans les introns des ARNs pré-messager (Figure 37). Chaque pri-miRNA transcrit peut contenir de multiples pré-miRNAs (Zamore et al. 2000). Après avoir été coupé par Drosha (une endonucléase RNase III), le pré-miRNA est transporté dans le cytoplasme pour être ensuite maturé par DICER libérant un miRNA de 21-23 paires de bases dit mature. Le brin antisens du miRNA est ensuite séparé de son brin sens par Ago2

puis associé au complexe RISC pour pouvoir soit dégrader son ARN messager cible, soit inhiber par blocage stérique la traduction grâce aux « p-bodies » (Liu et al. 2005). Contrairement aux siRNAs et shRNAs qui requièrent une complémentarité parfaite avec l'ARN qu'ils ciblent pour pouvoir avoir un effet d'inhibition, les microRNAs ont seulement besoin d'une complémentarité partielle. Le résultat est donc que l'expression d'un seul miRNA peut affecter des dizaines, voir des centaines de gènes différents (John et al. 2004; Chang et al. 2008).

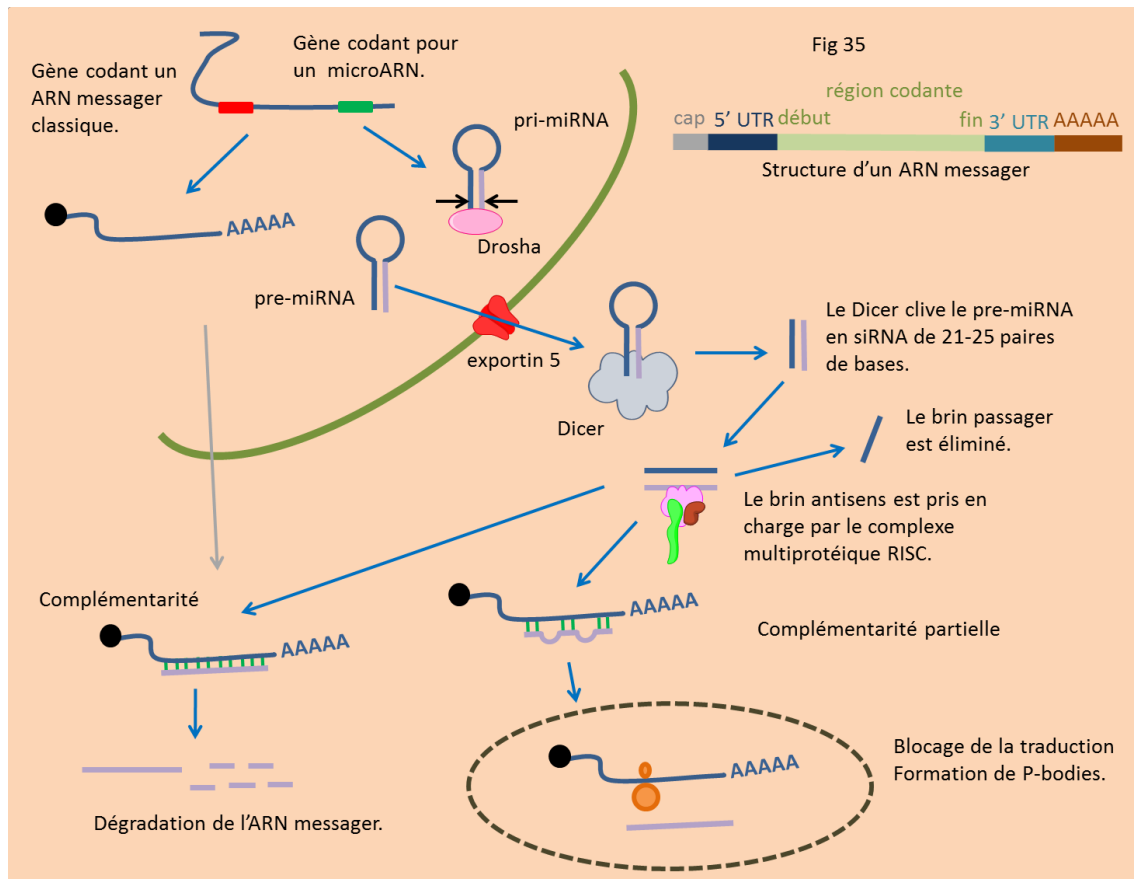


Figure 37 : Mécanisme d'interférence induit par les miRNAs.

Les premières hypothèses de mécanismes d'action suggéraient que les microRNAs interagissaient seulement avec la région 3'UTR de l'ARN messager pour exécuter leurs rôles de suppresseurs d'expression de gènes (Bartel 2004). Rigoustos et ses collègues ont montré que les miRNAs peuvent aussi reconnaître leurs séquences cibles dans la région codante de l'ARN messager (Tay et al. 2008). Puis, l'équipe de Steitz a montré que les miRNAs peuvent agir dans la région 5'UTR soit en éteignant le gène cible (Lytle, Yario, et Steitz 2007) ou soit en le sur-exprimant (Ørom, Nielsen, et Lund 2008). Il a aussi été montré que les miRNAs peuvent agir sur une combinaison de régions de l'ARN messager. Cependant la région de l'ARN messager où les miRNAs sont les plus efficaces est la région 3'UTR. Les miRNAs peuvent aussi réguler l'expression des gènes directement en agissant sur l'ADN (Place et al. 2008).

Les microRNAs constituent un niveau supplémentaire dans la régulation de l'expression génétique et ont une dualité d'action sur l'ADN génomique et l'ARN messager. Leur expression est dépendante du type cellulaire. Il a été montré que la sur-expression de microRNAs particuliers est souvent associée à des pathologies, notamment le cancer. L'analyse du profil d'expression des microRNAs est devenue une nouvelle méthode de diagnostic, puisqu'ils se révèlent être d'excellents biomarqueurs de certaines pathologies.

L'expression des petits ARNs exogènes dans les cellules est possible en réalisant une transfection ou une transduction virale soit avec des pri-miRNAs, soit avec des pre-miRNAs, soit avec des miRNA matures ou soit avec des siRNAs (Figure 38).

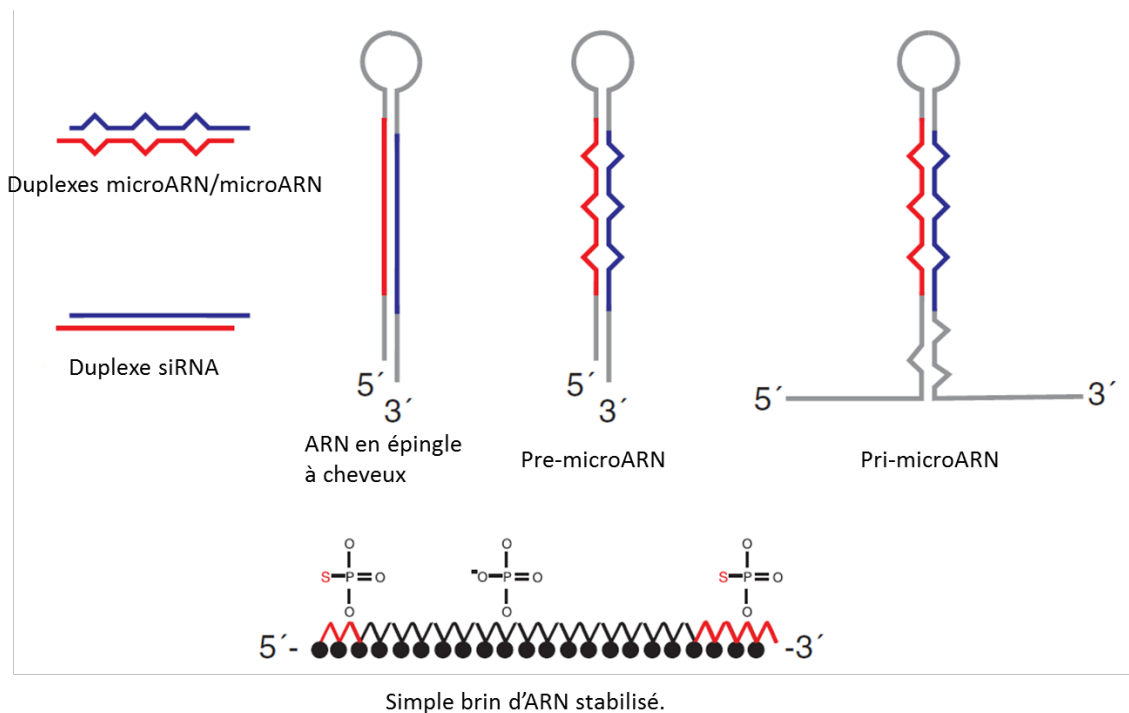


Figure 38 : Différents types d'ARNs pouvant induire le mécanisme d'ARN interférence.

1) Les « Antagomirs ».

Les oligonucléotides antisens (ASOs) sont de courts fragments d'ARN ou d'ADN simple brin qui s'hybrident à d'autres acides nucléiques par des liaisons de type « Watson-Crick ». En général les ASOs ciblent spécifiquement un ARN messager pour inhiber la traduction de celui-ci. Les ASOs peuvent aussi provoquer la destruction d'un brin ARN lors de la formation d'hétéroduplexes ARN-ADN, par la RNase H. Du fait de cette propriété il a donc été envisagé d'utiliser l'approche antisens pour neutraliser les microRNAs. Ces oligonucléotides antisens sont dénommés anti-microRNAs.

Les « Antagomirs » sont la première classe d'anti-microRNAs à avoir été utilisée chez les mammifères (Krützfeldt et al. 2005; Krützfeldt et al. 2007). Ces oligonucléotides antisens ciblent les miRNAs matures. Ces ASOs synthétiques sont généralement modifiés avec des groupements 2'-O-Méthyles (2'-O-Me) en position 2' du pentose. Ils portent des liaisons

inter-nucléotides phosphorothioate à chaque extrémité et sont couplés à un groupement cholestérol en position 3' (Figure 39).

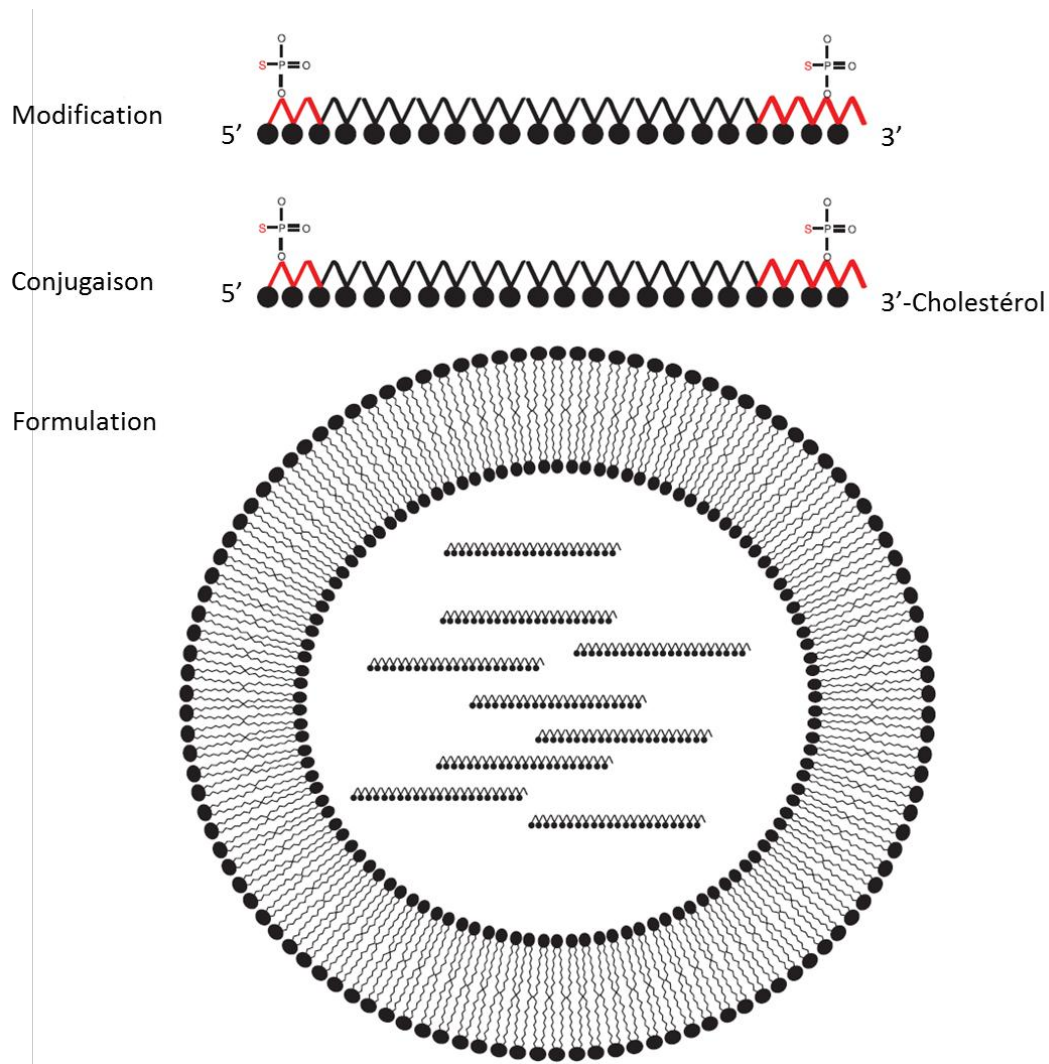


Figure 39 : Structure et formulation des anti-microRNAs.

Le concept d'activité des « Antagomirs » a été réalisé *in vivo*. L'inhibition de microRNAs cibles a été montrée chez la souris dans plusieurs organes, comme le foie, les poumons, le cœur, les intestins, les graisses, la moelle épinière, les muscles, les ovaires et les glandes surrénales. Cependant, l'activité des « Antagomirs » injectés par voie veineuse demande des doses d'oligonucléotides très élevées, de l'ordre de 80 mg/kg. Ceci limite leur potentielle utilisation à des fins thérapeutiques.

D'autres types de modifications chimiques (Figure 40) telles que les 2'-O-Méthoxyéthyles, 2'-Fluoro et 2',4'-Méthylène (« Locked Nucleic Acid », LNA) ont permis à la fois d'augmenter la résistance vis-à-vis des nucléases et l'affinité d'hybridation des anti-microRNAs sur leurs cibles (Davis et al. 2006; Esau et al. 2006; Ørom, Kauppinen, et Lund 2006). La supériorité des anti-miRNAs portant des groupements fluorés en position 2' avec des bases LNAs par rapport aux anti-miRNAs modifiés avec des 2'-O-Méthyles a été rapportée (Lennox et Behlke 2010). Une meilleure résistance vis-à-vis de la dégradation est notamment confirmée par ces travaux.

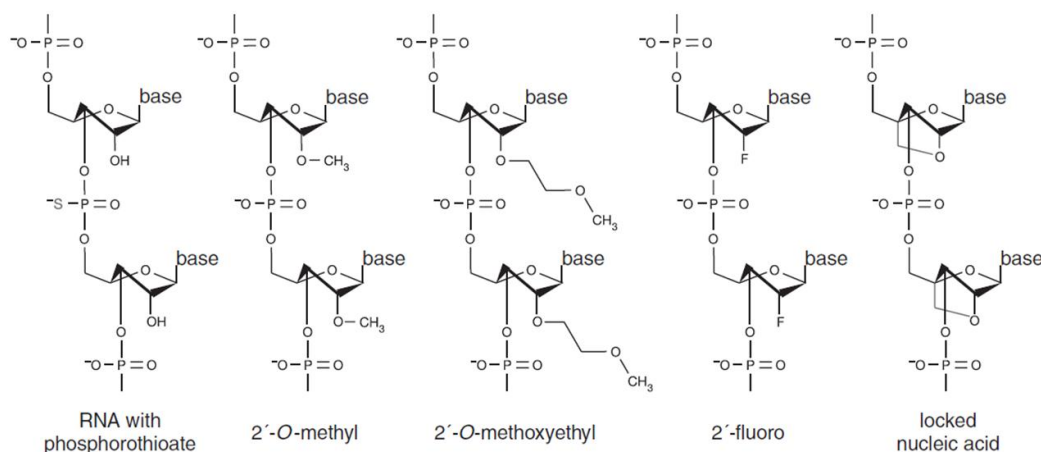


Figure 40 : Modifications chimiques pour améliorer la stabilité des oligonucléotides antisens. (Broderick et Zamore 2011)

L'intérêt des anti-miRNAs en thérapie est actuellement exploré. Elmén et ses collègues ont montré notamment qu'un oligonucléotide 16-mère modifié avec des bases LNAs ciblant le miRNA-122, injecté à 10 mg/kg quotidiennement par voie intra-veineuse pendant 5 jours, permet la diminution du niveau de cholestérol chez les singes verts d'Afrique sur une durée de 20 jours (Elmén et al. 2005). Les conclusions de ces travaux chez le singe sont que les anti-miRNAs à base de LNAs sont spécifiques, stables et non toxiques lorsqu'ils sont administrés par voie systémique. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour le développement d'anti-miRNAs thérapeutiques (Tableau 2).

Tableau 2 : Anti-miARNs en développement clinique (Broderick et Zamore 2011).

Compagnie	Maladies, infections	Modifications chimiques	Phase clinique
Regulus Therapeutics	Maladies cardiovasculaires, maladies du métabolisme, cancer, hépatite C.	Inhibiteurs de microARN avec des modifications 2'-OMe, 2'-Fluoro ARN, sucres bicycliques.	Pré-clinique
Santaris Pharma	Maladies du métabolisme, cancer, hépatite C.	Inhibiteurs de microARN avec des modifications LNA.	Inhibiteur miR122: Phase I complétée Phase II initiée
miRagen Therapeutics	Maladies cardiovasculaires et maladies du muscle.	Inhibition et remplacement des microARNs.	Pré-clinique
Mirna Therapeutics	Cancers du poumon et de la prostate.	Remplacement des microARNs en utilisant des siRNAs.	Pré-clinique

B. LES PETITS ARNS INTERFERENTS : siRNAs.

I. Structure des siRNAs synthétiques.

En 2001, Tuschl et ses collègues ont montré que de courts doubles brins d'ARN induisent la dégradation spécifique d'ARN messager sans être immunogènes (Elbashir et al. 2001). Selon Tuschl, les siRNAs sont actifs lorsqu'ils ont 21-23 paires de bases et qu'ils ont deux nucléotides dT non appariés aux extrémités 3' (« overhang »). Ce modèle de siRNAs reproduit les duplexes coupés par l'enzyme DICER. Ils sont composés d'un brin antisens (ou guide) qui porte l'activité biologique et d'un brin sens (ou passager). La région 5' du brin antisens est celle qui va être reconnue pour que le complexe RISC prenne en charge le siRNA.

La structure du duplexe de siRNA peut être modifiée grâce à la synthèse chimique (Figure 41). Bien que la plupart des duplexes siRNAs sont constitués de deux brins il a été montré qu'un siRNA formé de trois brins (un brin antisens intact et deux brins sens de 9-13 nucléotides) peuvent réduire l'effet « off-target » et améliorer l'activité. Ce type de duplexe est appelé « small internally segmented interfering RNA » (sisiRNA) (Bramsen et al. 2007). Un siRNA actif peut aussi être formé d'un seul brin de différentes manières. En effet des shRNAs peuvent être introduit de façon exogène (Siolas et al. 2005) ou à l'intérieur de la cellule (Brummelkamp, Bernards, et Agami 2002). Former une deuxième boucle en reliant les extrémités 3' et 5' d'un shRNA permet de former les siRNAs « Dumbbell » qui présentent l'avantage d'être actifs tout en étant protégés des nucléases (Abe, Abe, et Ito 2007). Il a également été montré qu'un simple brin antisens pouvait avoir une activité comparable à celle d'un duplexe siRNA (Holen et al. 2003).

La longueur du siRNA peut aussi être modifiée. La plupart des siRNAs ont une longueur de 19-21 nucléotides mimant le siRNA naturel issu du DICER, cependant il a été montré qu'augmenter la taille du duplexe permet d'améliorer l'efficacité (D.-H. Kim et al. 2005). En revanche pour éviter d'induire une réponse immunitaire interféron, il est important que la longueur du duplexe n'excède pas 30 nucléotides (Minks et al. 1979).

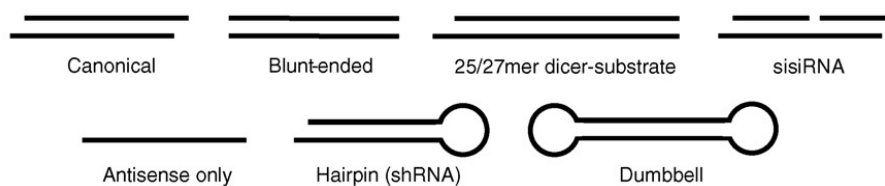


Figure 41 : Structures fonctionnelles des siRNAs.

Les siRNAs non chimiquement modifiés montrent une meilleure résistance vis-à-vis des nucléases que des oligonucléotides antisens (Bertrand et al. 2002). Cependant, l'addition de modifications chimiques sur les siRNAs augmente leur résistance à la dégradation, notamment dans un contexte *in vivo*. Pour cela, diverses modifications peuvent être apportées, soit sur le ribose du nucléotide ou dans les liens inter-nucléotides.

Les siRNAs peuvent induire des effets non spécifiques (« Off-target effect ») sur des gènes non ciblés. Ces effets sont expliqués par un « design » de séquence non optimal qui ne prendrait pas en compte la structure tridimensionnelle de la cible et l'accessibilité de la séquence cible dans l'ARN messager. Des fixations des siRNAs dans les régions 3'-UTR expliqueraient aussi ces effets non spécifiques (Birmingham, 2006) ainsi que l'induction de réponse interféron. Certaines modifications chimiques permettent de limiter à la fois les effets non spécifiques et l'induction d'une réponse immune, principalement les modifications de type 2'-O-Méthyle, 2'-Fluoro et les LNAs (Judge 2005,).

Enfin, d'autres modifications des siRNAs sont principalement effectuées pour générer des conjugués de siRNAs. Ces conjugués à base de lipide, peptide ou polyéthylène glycol ont pour but d'augmenter la pénétration dans les cellules et la pharmacodynamie des siRNAs *in vivo*. Les parties suivantes vont présenter les modifications chimiques majeures des siRNAs.

2. Modifications des sucres.

Les modifications des siRNAs les plus utilisées sont les modifications des sucres. La plupart des modifications touchent la position du 2'-OH du pentose qui n'est pas nécessaire à l'activité du siRNA (Chiu et Rana 2003) (Figure 42).

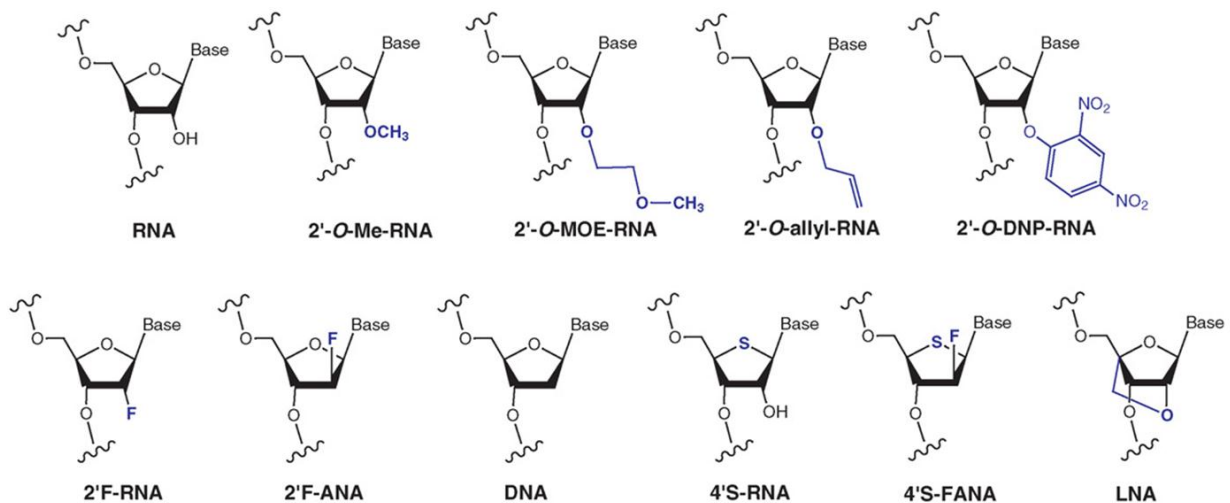


Figure 42 : Modifications des sucres (Watts, Deleavey, et Damha 2008).

a) Modification 2'-O-Méthyle (2'-O-Me).

La modification 2'-O-Me sur les nucléotides ARNs permet d'augmenter l'affinité d'hybridation ainsi que la stabilité vis-à-vis des nucléases. Généralement, cette modification permet de conserver l'activité (Kraynack et Baker 2006; Choung et al. 2006). Cependant, cette modification peut également diminuer l'activité des siRNAs dans certains cas (Czaderna et al. 2003), notamment leur introduction trop extensive n'est pas bien tolérée par les duplexes de siRNA. Davis et ses collègues ont montré que l'introduction de nombreuses modifications de la position 2' du brin sens induisait une faible activité des

siRNAs, mais ils ont aussi montré que des oligonucléotides anti-miARNs qui portent ces modifications étaient très actifs pour bloquer les miRNAs (Davis et al. 2006). Ceci suggère que l'introduction des 2'-O-Me doit être très sélective et c'est notamment le cas quand elle est destinée à supprimer les risques de réponse immune induite par les ARNs double brin (Judge et al, Mol Ther, 2006).

b) Modification 2'-O-Méthoxyéthyle (2'-O-MOE).

Jusqu'à présent les modifications 2'-O-Méthoxyéthyles (2'-O-MOE) ont été utilisées sur les positions 3' non appariées du duplexe siRNA et ont montré une bonne extinction du gène cible *in vivo* (Dorn et al. 2004). Un autre groupe a montré que ces modifications 2'-O-MOE pouvaient être introduites aux extrémités du brin sens mais ne pouvaient pas être introduites dans le brin antisens (Prakash et al. 2005). De la même manière des modifications 2'-O-allyles peuvent être utilisées aux extrémités 3' non appariées du siRNA mais pas à l'intérieur de sa séquence (Amarzguioui et al. 2003).

c) Modification 2,4-dinitrophényl éther.

Chen et ses collègues ont montré que l'introduction de cette modification sur 70% des positions 2'-OH d'un siRNA augmente l'affinité du siRNA pour sa séquence cible tout en améliorant l'extinction du gène ciblé. Cette modification permet également d'améliorer sa résistance contre les nucléases (Chen, Shen, et Wang 2004).

d) Modification 2' Fluoro-RNA (2' F-RNA).

La substitution de la fonction 2'-OH par des fonctions oxygénées est possible par une fonction fluorée. La modification 2' F-RNA est l'une des plus utilisée et elle peut être portée aussi bien par le brin sens que par le brin antisens du siRNA (Harborth et al. 2003). Un siRNA complètement modifié avec des groupements 2' F-RNA peut conserver son activité (Blidner et al. 2007). Les modifications 2'-F-RNA permettent également aux siRNAs d'être plus stables en présence de sérum (Layzer et al. 2004).

e) Modification 2' F-ANA.

La modification de la stéréochimie du fluor des groupements 2' F-RNA permet d'obtenir la modification 2' F-ANA qui a été développée au départ pour mimer l'ADN (Wilds et Damha 2000). Les modifications 2' F-ANA sont bien acceptées lorsqu'elles sont intégrées aux duplexes siRNAs y compris lorsque tout le brin sens est modifié. Malgré tout, le brin antisens doit être que partiellement et sélectivement modifié (Dowler et al. 2006).

f) Modification ADN.

L'ADN lui-même peut être considéré comme une modification qui ne porte pas de groupement électro-négatif en position 2' du duplexe siRNA. Par exemple, depuis le début des recherches sur les siRNAs, des nucléotides ADN ont été ajoutés aux extrémités 3' non appariées. Quelques nucléotides ADN peuvent être insérés dans les siRNAs sans diminuer leur efficacité. Chiu et ses collègues ont montré qu'un brin antisens entièrement ADN portant quelques modifications 2' F-RNA est fonctionnel selon le mécanisme d'ARN interférence (Chiu et Rana 2003).

g) Modification 4' S-RNA.

Le pentose peut aussi être modifié : les modifications 4' S-RNA permettent d'augmenter la résistance du siRNA vis-à-vis des nucléases, elles sont souvent utilisées en positions terminales sur le siRNA (Hoshika et al. 2007; Dande et al. 2006). Lorsque les modifications 4' S-RNA sont portées par le brin antisens, Hoshika et ses collègues ont montré que les siRNAs étaient moins efficaces que des siRNAs non modifiés, mais étaient plus efficaces que des modifications 2'-O-Me aux mêmes positions (Hoshika et al. 2005). Il a également été montré qu'il n'était pas possible d'utiliser les 4' S-RNA dans la partie centrale du brin antisens sans perte d'efficacité.

h) Modification 4' S-FANA.

Les nucléotides 4'S 2'F-ANA portent des modifications en positions 2' et 4'. Il a été montré que lorsque ces modifications sont portées par le brin antisens, les résultats obtenus étaient comparables à ceux obtenus avec les modifications 2' F-ANA (Watts et al. 2007). La déstabilisation induite par les nucléotides 4'S 2' F-ANA ne permet pas de les introduire en grand nombre dans les duplexes siRNAs.

i) Modification LNA.

Les LNAs « Locked Nucleic Acid » sont des nucléotides modifiés dont le pentose a été rigidifié par le biais d'une liaison méthylène entre le carbone de la position 4' et l'oxygène de la position 2'. Leur rigidité permet d'augmenter leur affinité d'hybridation. Les extrémités du brin sens et les positions 3' non appariées des siRNAs sont souvent les sites préférentiels de modifications LNA (Hornung et al. 2005; Elmén et al. 2005; Mook et al. 2007). Elmén et ses collègues ont aussi montré que lorsque quelques LNAs sont placés sur le brin antisens, le siRNA est toujours actif. Malgré tout, cela demande une introduction très sélective de cette modification. Des travaux plus récents suggèrent que les LNAs permettraient de limiter les réponses non spécifiques (Fluiter, *Methods Mol Biol*, 2009).

3. *Modification des liaisons phosphate.*

a) Liaison phosphorothiate (PS).

Quelques variations de la liaison phosphodiester sont aussi tolérées par la machinerie ARN interférence (Figure 43). Il a été montré que les siRNAs qui portent des liaisons phosphorothioates présentent une efficacité comparable (Amarzguioui et al. 2003; Harborth et al. 2003) ou légèrement inférieure (Chiu et Rana 2003) (Hall et al. 2004) à celle de siRNAs nus. Certains groupes ont montré que si les liaisons PS étaient placées au centre du duplexe, les siRNAs n'étaient plus actifs (Schwarz, Tomari, et Zamore 2004). Cependant, des exemples ont prouvé que la capacité du siRNA à porter un des brins totalement PS dépend de l'architecture des brins (Kraynack et Baker 2006). Amarzguioui et ses collègues ont aussi montré que l'utilisation abondante de liens phosphorothiates sur les siRNAs se révèle toxique (Amarzguioui et al. 2003). Braasch et ses collègues ont quant à eux démontré que les modifications PS n'avaient pas de réel effet sur la biodistribution des duplexes siRNAs (Braasch et al. 2004).

b) Liaison boranophosphate.

Les liaisons boranophosphates sont fonctionnelles et ont montré une meilleure activité du siRNA qui les porte, en comparaison avec les liaisons inter-nucléotides PS et phosphodiesters. Mais pour que l'efficacité du siRNA soit maximale les liens boranophosphates ne doivent pas être placés au centre du siRNA. Hall et ses collègues ont aussi montré que les liaisons boranophosphates permettent aux siRNAs d'être plus résistants face aux nucléases (Hall et al. 2004).

c) Liaison 2'-5'.

Le lien phosphodiester naturel permet de faire la liaison entre les positions 3' et 5' des pentoses mais il est possible de déplacer cette liaison entre les positions 2' et 5'. Cette modification ne peut être portée que par le brin sens du duplexe siRNA et s'accompagne d'une perte d'efficacité du siRNA (Prakash et al. 2006). Iwase et ses collègues ont aussi montré qu'il était possible de remplacer la liaison phosphodiester par une liaison amide (Iwase, Toyama, et Nishimori 2007).

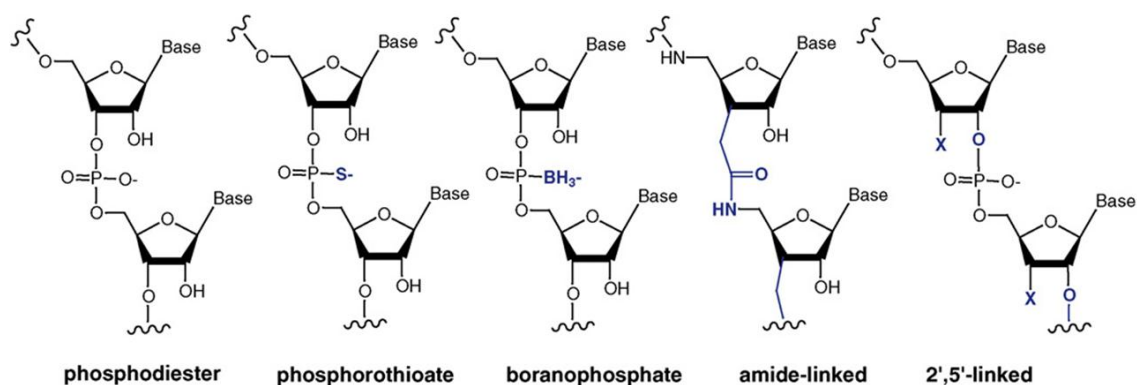


Figure 43 : Liaisons inter-nucléotides utilisées dans les duplexes siRNAs.

4. Conjugés de siRNA.

a) Conjugés hydrophobes et lipidiques.

Pour ajouter d'autres fonctionnalités aux siRNAs des marqueurs hydrophobes ont été greffés sans perturbation du mécanisme d'ARN interférence. Des fluorophores tels que la Cyanine 3 (Cy3), la Cyanine 5 (Cy5) et le TAMRA (dérivé de Rhodamine) sont couramment utilisés car ils permettent de suivre le devenir des siRNAs *in vitro* ou *in vivo*. Le cholestérol a également été conjugué à des siRNAs permettant une interaction avec l'Apolipoprotéine ApoB et permettant de diriger les siRNAs vers les cellules hépatiques et intestinales chez la souris (Soutschek et al. 2004). D'autres dérivés comme des longues chaînes alkyles ont été greffées sur les siRNAs pour augmenter leur pénétration cellulaire (Yamada, 2011).

b) Conjugés siRNA-ligands.

Des ligands tels que le folate sont eux greffés sur les siRNAs pour cibler les récepteurs membranaires au folate qui sont sur-exprimés dans les cellules cancéreuses (Dohmen et al. 2012). Plusieurs voies de synthèses sont développées pour produire des conjugués siRNA-oligosaccharide pour cibler notamment le récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes (Pourceau et al. 2010; Yamada et al. 2011). Des conjugués de siRNAs avec des motifs multimériques RGD cycliques ont été proposés pour cibler des cellules exprimant les intégrines $\alpha\beta_3$, comme les cellules de mélanome humain M21. Cette approche est prometteuse dans le cas d'une thérapie d'ARNs interférents anti-cancers (Alam, Juliano, Bioconj Chem, 2011).

c) Conjugués siRNA-CPP.

Les peptides de transduction (« Cell Penetrating Peptide », CPP), aussi appelé protéines de transduction, représentent des potentiels cargos pour la vectorisation intracellulaire des siRNAs. Ainsi, le peptide basique TAT (issu de la protéine trans-activatrice du virus de l'immunodéficience de type-1, VIH-1) a été conjugué à l'extrémité 3' du brin antisens d'un duplexe de siRNA (Chiu et al. 2004) (Figure 44). Ce peptide permet d'améliorer le passage du siRNA à travers les membranes cellulaires. Chiu et ses collègues ont montré que l'efficacité de la transfection du conjugué siRNA-TAT est comparable à l'efficacité de transfection du duplexe avec un agent de transfection commercial, la Lipofectamine, et que l'activité était spécifique du gène cible. La présence du peptide conjugué n'interfère pas avec le mécanisme d'ARN interférence. Plusieurs autres conjugués à base de CPP ont été développés.

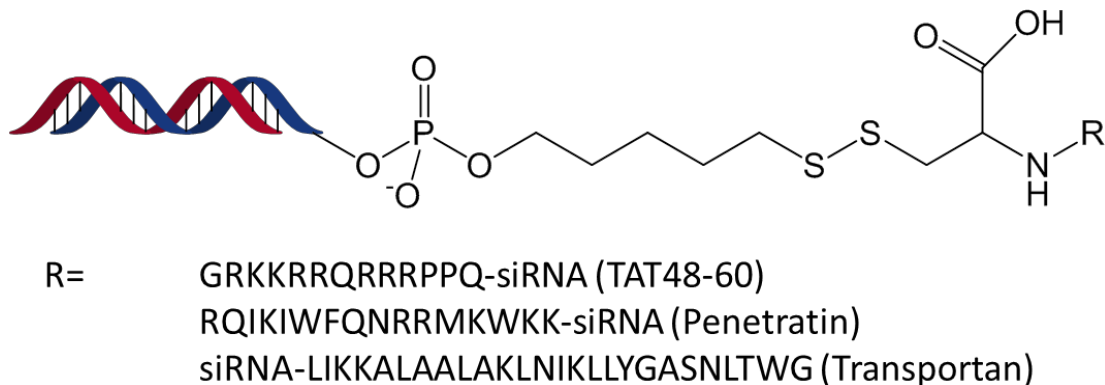


Figure 44 : Conjugués peptides duplexes siRNAs.

La position 5' du brin antisens est une position cruciale pour que le mécanisme d'ARN interférence ait lieu. Plusieurs équipes ont utilisé des ponts disulfures pour conjuguer en 5' du siRNA des CPPs comme la pénétratine et le transportan. Ces conjugués permettent aux siRNAs de traverser la membrane cellulaire et la liaison entre le peptide et le siRNA est coupée au niveau intracellulaire libérant ainsi un siRNA actif (Muratovska et Eccles 2004). Le clivage du peptide conjugué au duplexe siRNA induit une meilleure prise en charge du brin antisens par le complexe RISC. Dans ce cas l'extinction du gène est comparable à celle obtenue avec une formulation de lipides cationiques.

Des duplexes siRNAs conjugués à la pénétratine par l'intermédiaire d'un pont disulfure ont été utilisés pour transfecter de cellules neuronales mammifères (Davidson et al. 2004). Lors de cette étude, il a été montré que le conjugués permettent de réduire l'expression du gène cible sans toxicité apparente. Cependant le fait de conjuguer un peptide sur le duplexe siRNA n'a pas semblé améliorer la stabilité du siRNA. Moschos et ses collègues ont montré que des conjugués CPP-siRNA exposés à du mucus d'alvéole bronchique de souris subissent autant de dégradations que des siRNAs non conjugués (Moschos et al. 2007). Cependant il a été montré que certains CPP-siRNA conjugués éteignent bien l'expression du gène cible mais provoque une réponse immunitaire. En effet le conjugué Pénétratine-siRNA provoque une élévation de la sécrétion de cytokine inflammatoire (interféron- α), provoque également des nécroses, et favorise la prolifération tumorale (TNF- α). Les conjugués siRNA-TAT (48-60) eux ne provoquent aucune réponse immunitaire.

d) Conjugués hydrophiles (PEG).

Le poly (éthylène glycol) (PEG) est un polymère hydrophile non ionique et biocompatible. Park et ses collègues ont conjugué le polymère PEG sur un duplexe siRNA par l'intermédiaire d'un pont disulfure (S. H. Kim et al. 2006) , ils ont ensuite condensé le conjugué siRNA-PEG avec un polymère cationique pour former des nano-particules colloïdales complexes de micelles polyelectrolites (PEC micelles). Les charges négatives de la partie siRNA sont ainsi masquées par le polymère cationique qui les neutralise en formant un cœur polyélectrolyte tandis que la partie PEG hydrophile va venir encercler ce cœur de polyélectrolyte. Le complexe formé est donc ainsi plus stable lorsqu'il est administré dans le flux sanguin tout en améliorant sa biodisponibilité. Le rôle de la couche externe PEG du complexe est aussi de prévenir des agrégations entre les particules. Elle forme une couche hydrophile qui masque totalement les charges ce qui permet à ces complexes de ne pas se lier à des composants du sang. Il a également été montré que les conjugués PEG-siRNAs seuls sont plus stables que le siRNAs nus en présence de 50% de sérum, la dégradation survient après 16 h d'incubation. Lorsque le conjugué PEG-siRNA est complexé avec un polycation, comme le polyéthylèneimine (PEI), puis incubé dans 50% de sérum, la dégradation apparaît seulement après 48 h. Ces particules ont également montré une grande efficacité pour la transfection.

e) Conjugués Aptamères.

Les conjugués d'aptamères et de duplexes siRNAs ont la capacité de cibler des récepteurs membranaire de cellules spécifiques, de plus ils sont compatibles avec le mécanisme d'ARN interférence. Conjuguer des aptamères sur des duplexes siRNAs pour obtenir une seule molécule permet de réduire le caractère immunogène que présenterai l'utilisation de ces deux molécules séparées. Les duplexes siRNAs conjugués à des aptamères sont simples à synthétiser et simple à modifier.

Des conjugués duplexes siRNA-aptamères ont été utilisés pour cibler l'antigène membranaire prostatique spécifique (PSAM) (McNamara et al. 2006; Dassie et al. 2009). Le domaine aptamère du conjugué cible les PSAM à la surface des cellules tumorales, les conjugués aptamère-siRNA sont ensuite endocytés, leurs domaines aptamères sont ensuite coupés enzymatiquement, puis le duplexe siRNA induit la mort des cellules tumorales en inhibant une protéine anti-apoptotique.

Bagalkot et ses collègues ont décrit un système de conjugués nano-particulaire à la fois constitué d'une grande surface pour y retenir les siRNAs tout en laissant les conjugués aptamères disponibles pour la reconnaissance des cellules cibles, d'une partie polymère cationique dite « éponge à proton » qui permet la libération dans l'endosome (à base de PEI), et enfin d'une partie « quantum dot » qui permet la localisation et la quantification intracellulaire du conjugué nano-particulaire (Bagalkot et Gao 2011) ([Figure 45](#)).

La formation de ces nanoparticules se fait en deux étapes. Dans un premier temps, les duplexes siRNAs seuls sont adsorbés à la surface de la nanoparticule pour réduire les charges et ainsi réduire les potentielles interactions entre les nanoparticules et les aptamères. Dans

un deuxième temps les conjugués siRNA-aptamère sont fixés à la surface de la nanoparticule.

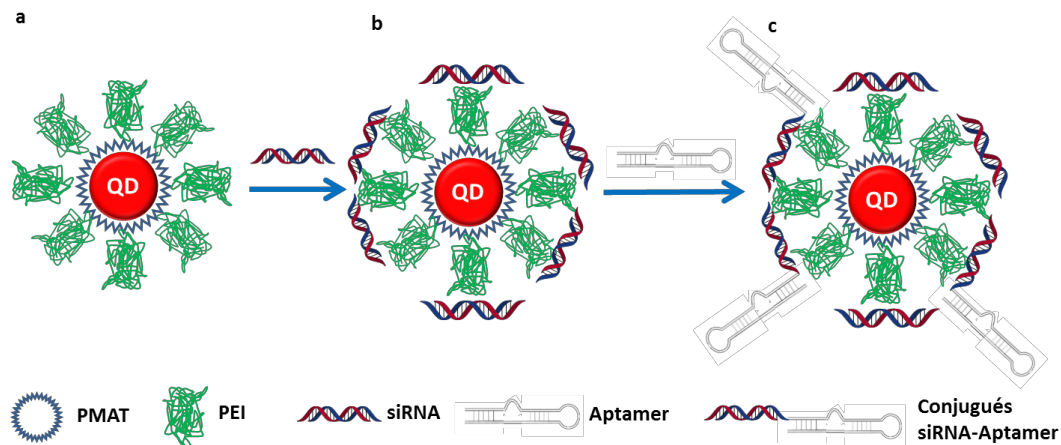


Figure 45 : Conjugés d'adsorption nano-particulaire. a) Le cœur constitué par le quantum dot est enrobé du polymère cationique PEI, b) L'adsorption des siRNAs est réalisée dans un premier temps, C) l'adsorption des conjugués avec aptamères est réalisée finalement, exposant des aptamères à la surface des nanoparticules, disponibles pour cibler les cellules tumorales.

Bagalkot et ses collègues ont également montré que l'adsorption des conjugués siRNA-aptamères en 2 temps sur les nanoparticules permet d'augmenter de 34% l'extinction dans les cellules par rapport aux nano-particules sans conjugués aptamères. En revanche, si l'adsorption des siRNAs et des conjugués siRNA-aptamères se fait simultanément, l'augmentation de l'extinction est seulement de 6%. Ces résultats indiquent que la préparation de nanoparticules exposant le mieux les aptamères à leur surface est la plus efficace.

CHAPITRE 3 : CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDE-SPERMINE.

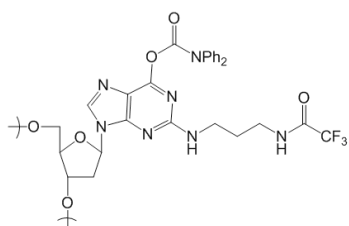
A. GENERALITES.

Un duplexe d'acides nucléiques est soumis à deux forces qui s'opposent, d'une part la formation du duplexe est soumise aux liaisons hydrogènes de type Watson-Crick, et la dissociation du duplexe est soumise aux répulsions électrostatiques entre les charges négatives des phosphates.

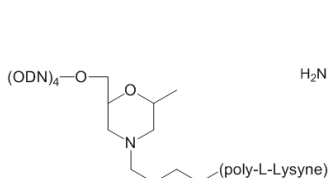
Dans le cas des PNAs (« Peptides Nucleic Acids »), qui possèdent des liens inter-nucléotides neutres, les répulsions électrostatiques entre les deux brins du duplexe sont diminuées ce qui favorise la stabilité du duplexe.

Considérant ceci, il est donc logique que l'ajout de charges positives sur la double hélice d'acides nucléiques favorise la stabilité de cette dernière. Suivant cette logique, plusieurs stratégies de modifications ont été développées pour permettre l'introduction de charges positives au sein des oligonucléotides pour augmenter leur affinité d'hybridation. Cependant le prérequis est que ces modifications ne doivent pas perturber les appariements entre les bases de manière à conserver la spécificité d'hybridation. D'autre part, les groupements cationiques ajoutés doivent être chargés dans les conditions de pH d'utilisation de ces oligonucléotides modifiés.

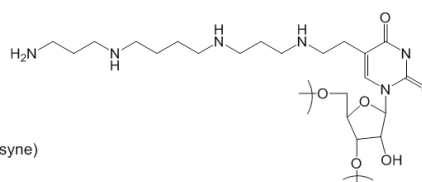
Ces charges positives peuvent être apportées à un oligonucléotide par des groupements ammonium ou guanidinium greffés soit au niveau de la liaison inter-nucléotide, soit au niveau des sucres ou des bases azotées ou soit aux extrémités 5' et 3' de l'oligonucléotide ([Figure 46](#)). Les charges cationiques peuvent être placées à différents sites au sein d'un même oligonucléotide. Les groupements cationiques peuvent être mono cationiques ou oligocationiques. Les oligocations sont généralement des structures à base de poly-amines linéaires ou branchées ou de structures riches en peptides (lysine, arginine). Le greffage de ces groupements cationiques est varié, il peut se faire grâce à des liaisons amides, thioéthers, disulfures, ou encore phosphoramidates. Plusieurs de ces structures cationiques sont représentées dans la ([Figure 46](#)).



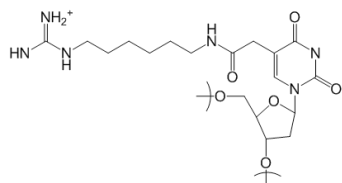
Manoharan et Al, *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 43, 7675.



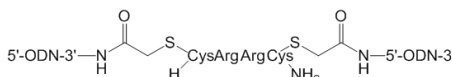
Lemaitre et Al, *Proceeding of the National Academy of Science*, 1987, 84, 648.



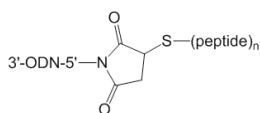
Marsh et Al, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, 2, 2103.



Okmichi et Al, *Angewante Chemie International Edition*, 2005, 44, 6682.



Wei et Al, *Bioconjugate Chemistry*, 1994, 5, 468.



Harrison et Al, *Nucleic Acid Research*, 1998, 26, 13, 3136.

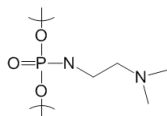
3'-ODN-5'-SS- (peptide)_n

Corey et Al, *Journal of American Chemical Society*, 1995, 117, 9373.

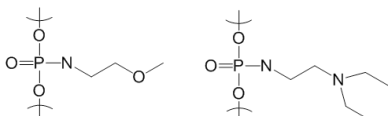
3'-ODN-5'- (peptide)_n

3'-ODN-5'- (peptide)_n - 3'-ODN-5'

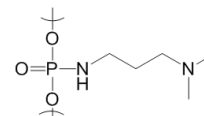
Wei et Al, *Nucleic Acid Research*, 1996, 24, 655.



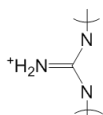
Chaturvedi et Al, *Nucleic Acid Research*, 1996, 24, 2318.



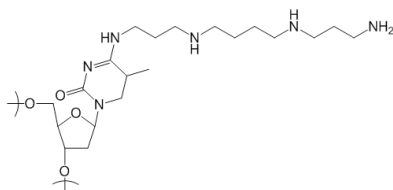
Dagle et Al, *Nucleic Acid Research*, 1996, 24, 2143.



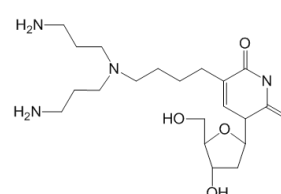
Vasseur et Al, *Nucleic Acid Research*, 2003, 31, 18, 5282.



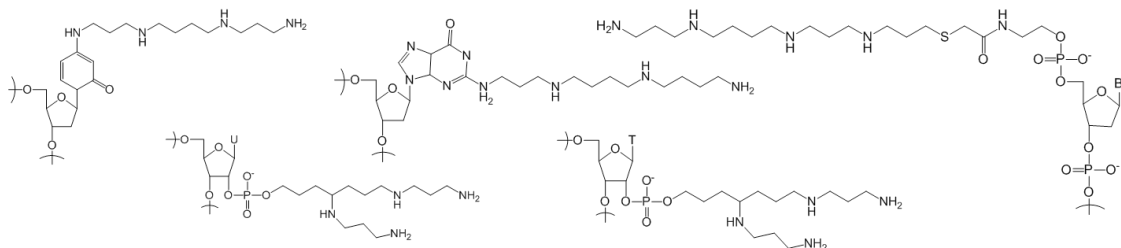
Deglane et Al, *ChemBioChem*, 2006, 7, 4, 684.



Barawkar et Al, *Biochemical and biophysical Research Communications*, 1994, 205, 1665.



Nora et Al, *Bioconjugate Chemistry*, 1995, 6, 54.



Sund et Al, *Tetrahedron*, 1996, 52, 37, 12275.

Figure 46 : Structures d'oligonucléotides cationiques.

1. *La spermine.*

Les polyamines sont des composants basiques naturellement présents dans les cellules où elles sont en contact avec les acides nucléiques, des protéines et des lipides anioniques de la membrane cellulaire. Parmi ces polyamines on trouve la putrescine, spermidine, la spermine ou encore la cadavérine (Tableau 3). Leurs fonctions dans la cellule sont variées, elles sont notamment indispensables à la division cellulaire.

Tableau 3 : Polyamines présentes dans la cellule.

Dénominations usuelles (dénominations chimiques)	Structures
Putrescine 1,4-butanediamine	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$
Spermidine N- [3-aminopropyl] -1,4 butanediamine	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$
Spermine N,N'-bis [3-aminopropyl]-1,4-butanediamine	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$
Cadavérine 1,5-pentanediamine	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$

La spermine est une polyamine naturellement présente dans les cellules à une concentration de l'ordre du millimolaire (Figure 47). La spermine porte 4 fonctions amines (deux primaires et deux secondaires) qui sont protonables à pH physiologique (Braunlin, Strick, et Record 1982). La spermine a une constante d'association K_a aux acides désoxyribonucléiques doubles brins de 10^4 M^{-1} . Au Laboratoire de Chimie Génétique, il a été montré en 1991 que la spermine est présente dans le petit sillon de la double hélice d'ADN en formant des liaisons hydrogènes (N Schmid et Behr 1991). Auparavant, Wemmer et ses collègues avaient montré que la spermine se déplace le long du petit sillon de la double hélice comme sur un rail (Wemmer et al. 1985). Les fonctions de la spermine sont nombreuses, comme son implication au niveau structurale (par sa propriété de condensation) et de réactivité de la chromatine, ainsi qu'à sa protection contre les radiations. Du fait de ces propriétés naturelles avantageuses, l'idée d'utiliser la spermine pour son affinité pour la double hélice d'ADN ou sa capacité d'interagir avec des polyanions a été exploitée. Le Laboratoire de Chimie Génétique a notamment contribué au développement des bases conjuguées à des spermines (Potier et al, voir parties suivantes). Plus récemment, il a été imaginé au Laboratoire de greffer la spermine aux extrémités 5' et/ou 3' des oligonucléotides pour permettre à ces derniers de s'hybrider plus vite à leurs séquences cibles.

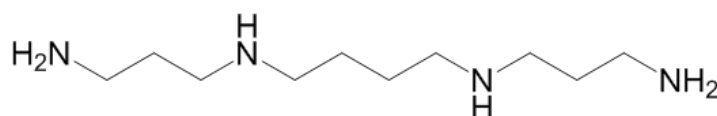


Figure 47 : Structure de la spermine.

2. *La spermine et les oligonucléotides.*

Lors des premiers travaux du Laboratoire, la spermine a été intégrée dans un oligonucléotide 11-mère par l'intermédiaire des guanines de la séquence. Pour cela, la spermine a été greffée sur les positions C-2 des guanines fluorées après l'élongation de l'oligonucléotide 11-mère, ce qui permet aux ions ammoniums de se loger dans le petit sillon. Le résultat majeur obtenu lors de ces premiers travaux était que le greffage de deux unités spermines sur l'oligonucléotide a permis d'augmenter la température de fusion du duplexe formé de 15° par rapport à celle du duplexe naturel (Nathalie Schmid et Behr 1995).

Lors de cette première approche seulement deux unités spermines avaient été greffées sur l'oligonucléotide. Dans le but d'introduire plus d'unités spermines sur l'oligonucléotide, il a été synthétisé en 1999 au Laboratoire une base spermine guanine phosphoramidite (P. Potier et al.). L'intérêt est d'intégrer cette base modifiée au moment de la synthèse de l'oligonucléotide et non pas d'ajouter la spermine post-synthèse. Cette nouvelle guanosine a permis la synthèse d'oligonucléotides de 22-mère portant jusqu'à 4 unités de spermine (P. Potier, Abdennaji, et Behr 2000; P. F. Potier et Behr 2001). Les résultats obtenus ont montré que les unités de spermine greffées sur l'oligonucléotide permettaient de stabiliser le duplexe en augmentant la température de fusion du duplexe d'environ 3°C par spermines. Cependant un des inconvénients de cette approche était que l'on ne pouvait pas placer les unités de spermine où l'on voulait dans la séquence de l'oligonucléotide puisque seules les guanosine portaient les groupements spermine. Pour rendre le positionnement des unités de spermine plus versatile il aurait fallu synthétiser les quatre bases modifiées avec la spermine. L'autre inconvénient qui a été rapporté est le fait que l'introduction de groupements spermine à l'intérieur de la séquence et non aux extrémités peut induire une hybridation non spécifique.

L'introduction de charges positives sur l'oligonucléotide par le biais d'unités de spermine permet d'améliorer l'affinité de l'oligonucléotide pour sa séquence cible tout en améliorant la stabilité du duplexe formé.

3. *La « base » spermine.*

Pour pouvoir greffer plus d'unités de spermine sur l'oligonucléotide et afin de stabiliser son hybridation avec sa séquence cible tout en restant spécifique, la spermine phosphoramidite a été proposée et synthétisée au Laboratoire par le Docteur Mitsuharu Kotera (Voinin, Behr, et Kotera 2007) ([Figure 48](#)). Le synthon spermine phosphoramidite peut être couplé de manière automatisée sur un synthétiseur en utilisant la chimie des phosphoramidites précédemment décrite. L'utilisation de ce synthon spermine phosphoramidite a pour but de greffer le nombre de spermines souhaité, en théorie à n'importe quelle position de la séquence d'un oligonucléotide. Malgré tout ce synthon est préférentiellement destiné à être greffé aux extrémités 5' et 3' des oligonucléotides, car à ces positions il n'interrompt pas la séquence nucléotidique.

Ce synthon contient successivement une fonction réactive phosphoramidite, un petit espaceur alkyle (chaîne en C₄), une spermine dont les amines sont protégées sous forme d'acide trifluoroacétique (TFA), un petit espaceur alkyle (chaîne en C₄) et se termine par une fonction hydroxyle protégée par un diméthoxytrytile (DMT). La présence du DMT permettra de quantifier le couplage de chaque phosphoramidite spermine à chaque cycle de synthèse.

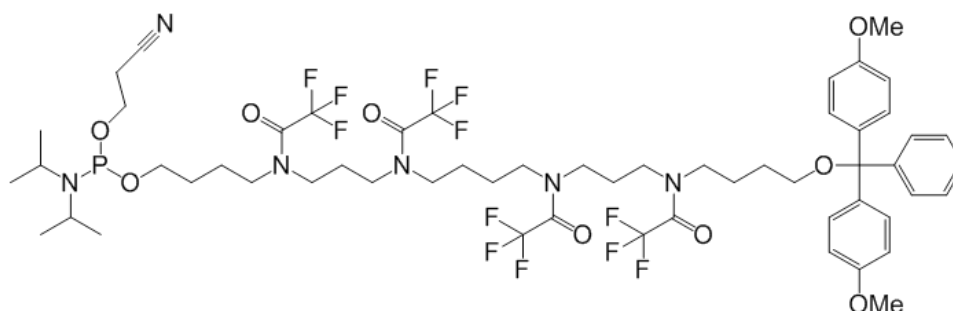


Figure 48 : Synthon phosphoramidite spermine DMT.

Depuis la démonstration en 1991 que la spermine interagit avec le petit sillon de la double hélice d'ADN, diverses stratégies ont été employées pour greffer des unités de spermine sur des oligonucléotides dans le but que ces derniers puissent bénéficier des propriétés de la spermine (Figure 49). Le but étant d'améliorer l'hybridation tout en restant spécifique. Je détaillerai plus loin dans le manuscrit les avantages de la dernière stratégie employée, celle d'utiliser le synthon spermine phosphoramidite pour des applications en diagnostic et en thérapie.


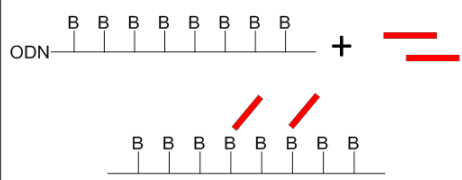
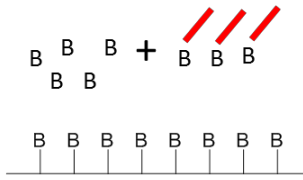
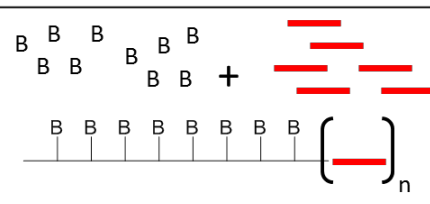
Année	Positionnement de la spermine	Résultats
1991 (Schmid et Al)	 <p>ADN</p> <p>Spermine</p>	La spermine est localisée dans le petit sillon de la double hélice d'ADN.
1995 (Schmid et Al)	 <p>ODN</p>	Augmentation de 15°C de la température de fusion par rapport au duplexe naturel.
1999 (Potier et Al)		Possibilité de greffer jusqu'à 6 unités spermine sur un oligonucléotide 22-mères. Inconvénient: aspécificité.
2007 (Voirin et Al)		Greffage automatisé des unités spermine. L'affinité est améliorée et l'hybridation est spécifique.

Figure 49 : Stratégies de couplage d'unités de spermine sur un oligonucléotide.

4. Le synthon spermine phosphoramidite.

Comme évoqué précédemment, la synthèse du synthon spermine phosphoramidite a été effectuée au Laboratoire dans le but de rendre plus versatile la synthèse des conjugués oligonucléotide-spermine. Dans le but d'éviter une potentielle toxicité qui serait due à des métabolites, le synthon cationique synthétisé au Laboratoire est basé sur la spermine, une polyamine que l'on trouve à l'état naturel. Le fait de procéder à une alkylation finale de la spermine ne semble pas induire de toxicité (Bergeron et al. 2001). Le Dr Mitsuharu Kotera a développé la synthèse en sept étapes en partant de la spermine pour arriver à la spermine phosphoramidite (Figure 50) (Voirin, Behr, et Kotera 2007). La spermine est protégée puis alkylée avec le α,ω -bishydroxyle pour former un diol compatible avec la synthèse des oligonucléotides. Ensuite, les amines sont protégées avec le groupement trifluoroacétyle (TFA) labile en milieu basique. Le couplage sur le diol des groupements diméthoxytrityles et phosphoramidite permet enfin au synthon de pouvoir être utilisé sur le synthétiseur d'oligonucléotides. Le synthon spermine phosphoramidite est obtenu avec un rendement final moyen d'environ 12%.

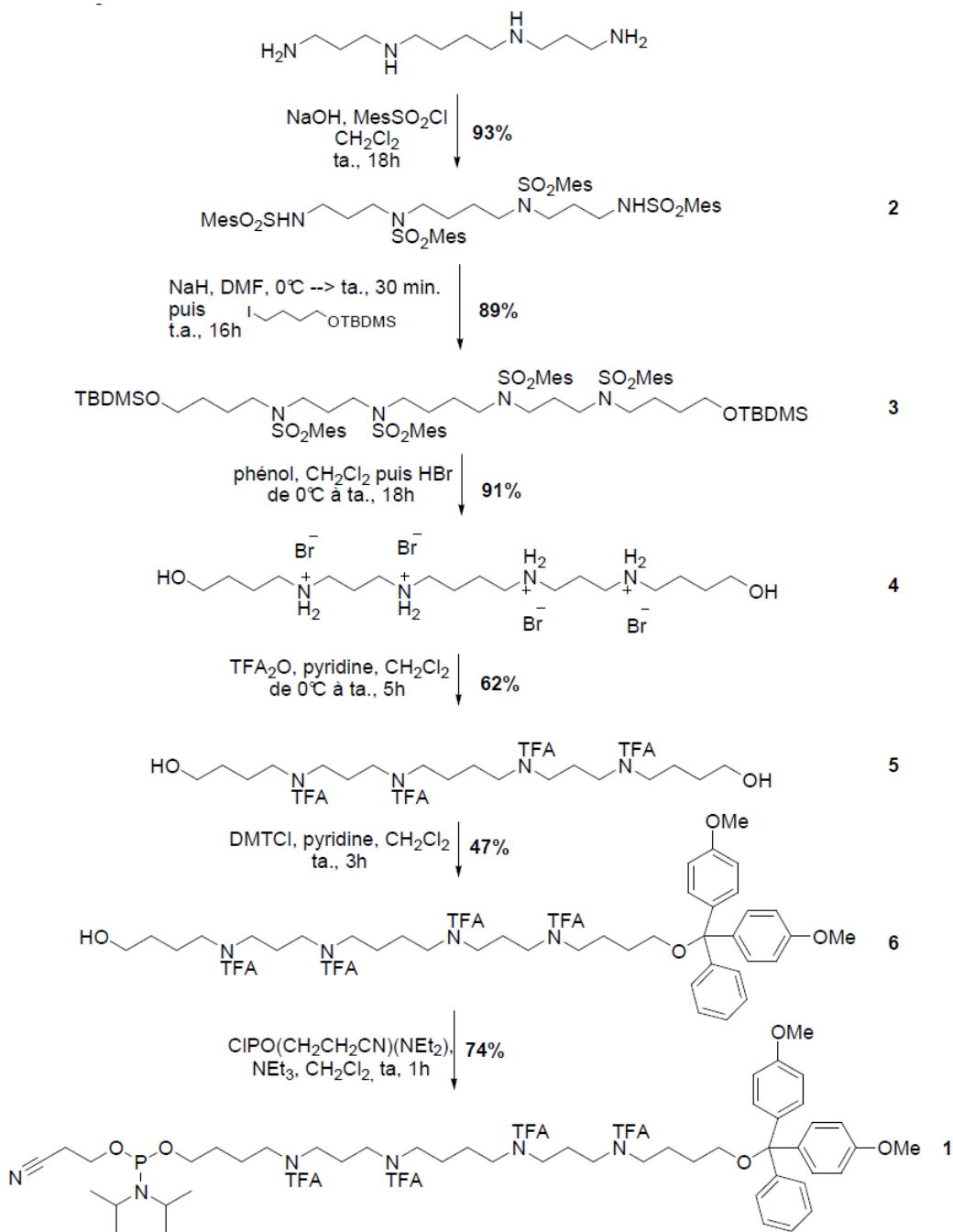


Figure 50 : Schéma de synthèse de la spermine phosphoramidite.

La phosphoramidite spermine **1** a été synthétisée à partir de la spermine. Plus en détails, la tétrakis(mésitylsulfonyl)spermine **2**, préparée à partir de la spermine, a été bisalkylée pour former le composé **3**. Après déprotection totale de l'intermédiaire **3** en milieu acide, les deux fonctions alcool du produit brut bis (C4-OH) spermine tétrahydrobromure **4** ont été protégées par de l'anhydride trifluoroacétique dans la pyridine. Ensuite, les deux esters terminaux formés ont été hydrolysés en conditions neutres pour donner le diol **5**. La monotritylation de **6** a été réalisée statistiquement en utilisant un équivalent molaire de chlorure de diméthoxytrytile (DMT-Cl) pour donner le composé **7** avec 43% de rendement. Le diol **6** n'ayant pas réagi et le composé bis-tritylé ont été récupérés et ré-équilibrés en conditions légèrement acides (TFA dans le dichlorométhane) pour obtenir **7**. Enfin, la phosphorylation de **7** a permis d'obtenir la phosphoramidite **1** (notée **2** dans la suite) désirée.

B. LES CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDE-SPERMINE CATIONIQUES.

Le développement du synthon spermine phosphoramidite et son couplage sur un oligonucléotide de façon automatisée rend l'accès aux oligonucléotides cationiques très simple. Etant donné que l'élongation de l'oligonucléotide cationique s'effectue sur un synthétiseur automatique sur support solide, il est possible de greffer le nombre d'unités de spermine souhaitées. C'est ce nombre variable d'unités de spermine qui va déterminer les propriétés de l'oligonucléotide qui les porte. L'oligonucléotide est naturellement chargé négativement de par ses liaisons phosphates.

Si quelques unités spermines cationiques sont greffées sur l'oligonucléotide, c'est-à-dire que le nombre d'amines apporté par les spermines reste bien inférieur à celui des phosphates de l'oligonucléotide, alors ce dernier aura toujours une charge globale négative. Dans ce cas, on s'attend à ce que les charges positives apportées diminuent les répulsions électrostatiques lors d'une hybridation avec une séquence complémentaire. On s'attend alors à augmenter les cinétiques et affinités de brins complémentaires sans affecter la spécificité d'hybridation. Une fois hybridé, on attend également une stabilisation du duplexe formé. Les conjugués oligonucléotide-spermine de charge globale négative trouvent leurs applications en biologie moléculaire pour l'hybridation et la PCR ([Figure 51](#)).

En revanche, lorsqu'un grand nombre d'unités cationiques de spermine est greffé sur l'oligonucléotide, c'est-à-dire que le nombre d'amines apporté par les spermines est bien supérieur à celui des phosphates de l'oligonucléotide, alors il aura une charge globale positive. Ce conjugué aura donc la capacité d'interagir par liaison électrostatique avec des polyanions. Ainsi, ces conjugués de charge globale positive peuvent potentiellement interagir avec les nombreux composants polyanioniques (comme beaucoup de protéoglycanes) des membranes cellulaires. Cette propriété est exploitable pour faire pénétrer ces conjugués dans des cellules et trouvent une application potentielle dans le domaine de la thérapie à base d'oligonucléotides.

Il est également possible de produire des conjugués de charge globale neutre, c'est à dire qu'il y a autant d'amines apportées par les spermines que les phosphates de l'oligonucléotide. La conséquence de ce caractère neutre est la génération de matériel inerte et insoluble. L'utilisation de ce type de conjugué n'a donc pas été exploitée.

Charge Globale

-	0	+
---	---	---

Applications :
 - hybridation moléculaire
 - amorce d' amplification PCR
 - sonde d' hydrolyse de qPCR

-interaction avec des polyanions
 -pénétration cellulaire
 sans agent de transfection

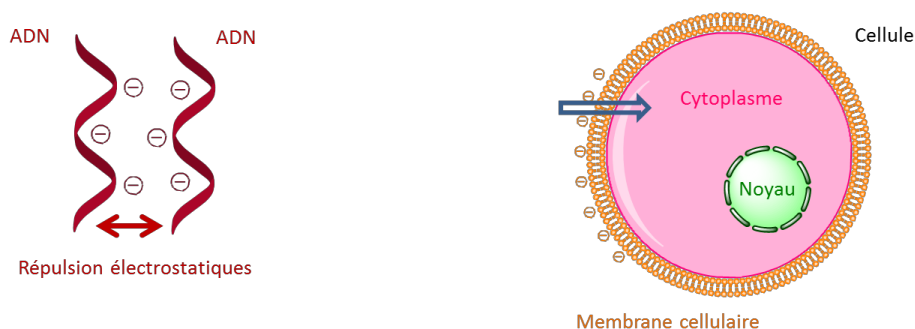


Figure 51 : Applications des oligonucléotides cationiques selon leur charge globale.

Il est possible de coupler des unités cationiques de spermine aussi bien sur un oligonucléotide ADN qu'ARN. Quatre à 6 unités de spermine seront couplées sur un oligonucléotide ADN, d'environ 20-mère, pour les applications en biologie moléculaire, tandis que 25 à 30 unités de spermine seront couplées sur un ARN interférent, environ 40-mère, pour les applications en thérapie.

1. Les conjugués oligodésoxyribonucléotide-spermine négatifs.

Les conjugués oligodésoxyribonucléotide-spermine, de charge globale négative, sont dédiés principalement aux applications de biologie moléculaire et PCR. Ces conjugués de 15-20-mères portent en général de 4 à 6 unités cationiques et sont donc de charge globale négative. Cependant, au Laboratoire des essais ont été réalisés sur de courts oligonucléotides sur lesquels a été greffé un nombre croissant d'unités cationiques faisant passer ainsi la charge globale du conjugué de négative à positive.

Les premiers résultats obtenus ont montré que pour 6 unités de spermine couplées sur un oligonucléotide 10-mère il y a une moyenne de 2,5 amines protonées par spermine (Pons et al. 2006). Il a aussi été montré que grâce aux unités cationiques de spermine il était possible d'obtenir une température de fusion d'environ 60-70°C pour un oligonucléotide court de 8-12-mère, ce qui présente un avantage important pour une utilisation en PCR quantitative multiplexe. Chaque unité de spermine permet d'augmenter la Tm de 4 à 7°C par unité conjuguée pour un oligonucléotide 8-12-mère (Noir et al. 2008). En revanche, il a été constaté que l'influence de chaque unité de spermine sur la température de fusion diminuait avec l'augmentation de la longueur de l'oligonucléotide sur lequel elles sont greffées. Cette diminution a été modélisée par l'équation $\Delta T_m / \text{sper} = 36 / (m - 3.2)$, ce qui signifie que pour un oligonucléotide de 20-mère, la Tm augmente d'environ 2°C par unité de spermine greffée (Figure 52). Ces résultats ont permis de montrer que les oligospermines peuvent neutraliser les charges négatives des phosphates sur le simple brin, ce qui favorise la formation du

duplexe avec le brin complémentaire en diminuant les répulsions électrostatiques y compris pour un déca-mère dans des concentrations physiologiques en sel (150 mM NaCl).

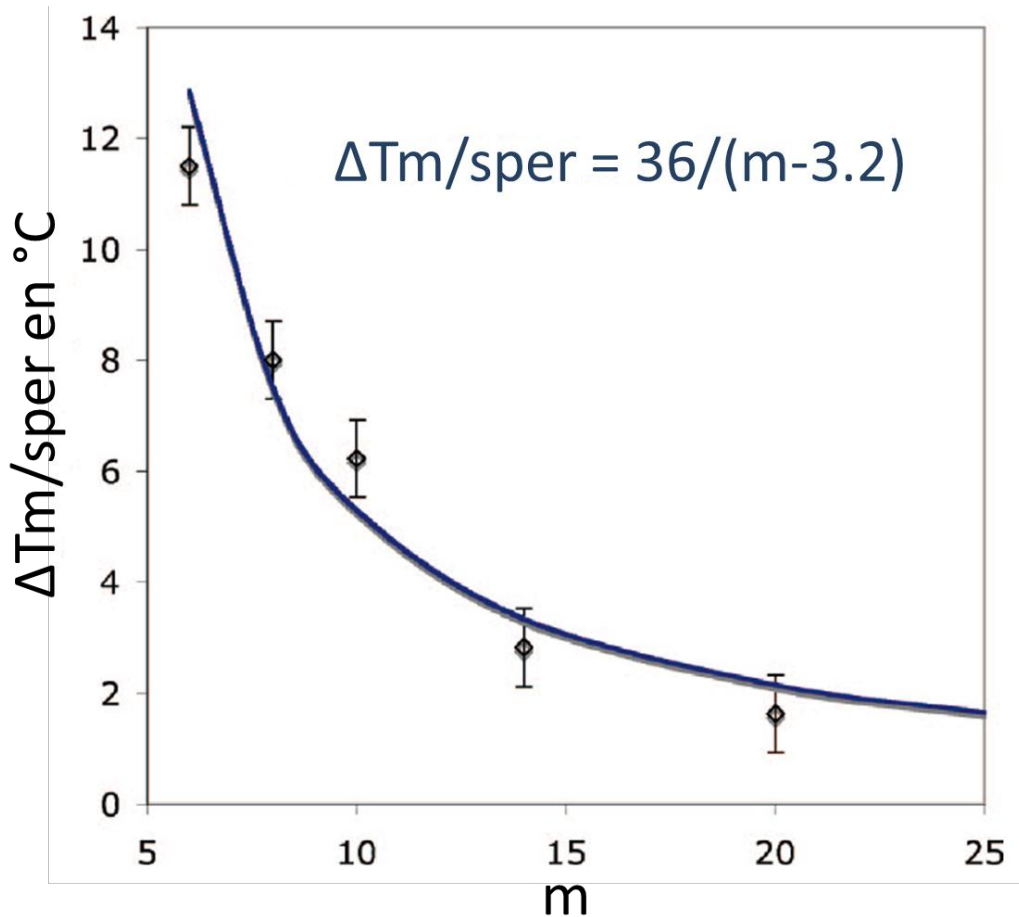


Figure 52 : Effet du nombre de spermines greffées sur la Tm en fonction de la longueur de l'oligonucléotide.

2. Les conjugués oligoribonucléotide-spermine positifs.

En 2009, au Laboratoire a été effectuée la preuve de concept qui montre l'activité biologique des conjugués oligonucléotide-spermine (Nothisen et al. 2009). Le concept est essentiellement démontré à partir des deux conclusions suivantes.

Les conjugués oligonucléotide-spermine pénètrent seuls dans les cellules animales en culture sans agent de transfection.

Dans un premier temps, la pénétration de conjugués ADN-spermine fluorescents ($3'-(ADN)_{19}$ (spermine) $_{18}$ -FAM-5') dans des cellules Hela a été constatée. Après 4 h d'incubation les conjugués fluorescents sont observés dans les cellules, plus précisément dans les vésicules, dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau (Figure 53 a). Pour déterminer l'influence du ratio amine/phosphate (N/P), déterminé par le nombre de spermines greffées et la longueur de l'oligonucléotide, sur l'entrée des conjugués fluorescents dans la cellule, une série de conjugués ADN de 12-mère avec un nombre croissant d'unités cationiques de spermine (0, 2, 5, 8, 11) a été synthétisée. Les conjugués ADN avec seulement 2 unités de spermine

(globalement négatifs) ont une distribution cellulaire comparable aux conjugués sans spermine après 24 h d'incubation à une concentration de 5 μ M. Les différences de distribution entre l'oligonucléotide contrôle sans spermine commencent à être significatives pour les conjugués portant 5 spermines pour des temps d'incubation plus courts et des concentrations plus faibles (Figure 53 b). La distribution et la pénétration intracellulaire la plus significative a été observée pour les conjugués portant 11 unités de spermine (globalement positifs) montrant la localisation des conjugués dans le cytoplasme (Figure 53 c).

Ces observations ont montré que les conjugués oligonucléotide-spermine de type ADN et de charges globales positives sont capables de pénétrer dans des cellules animales en culture à des concentrations de 2 μ M en absence de sérum et sans agent de transfection. Des conjugués oligonucléotide-spermine mais de charge globale négative pénètrent très peu dans les cellules. Enfin, les oligonucléotides non conjugués sans unité cationique spermine ne rentrent pas dans les cellules.

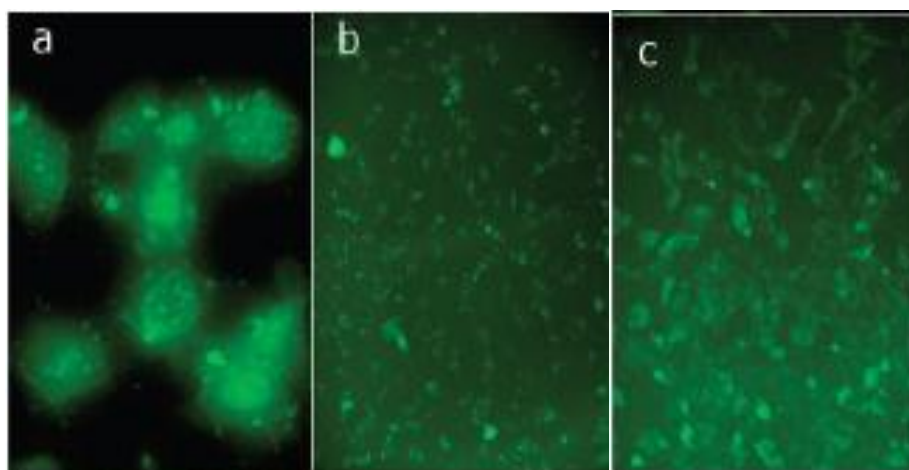


Figure 53 : Distribution intracellulaire d'oligonucléotides fluorescents ADN-spermines. a) oligonucléotide : 3'-(ADN)₁₉(spermine)₁₈-FAM -5' à 2 μ M incubé 4 h ; b) oligonucléotide : 3'-(ADN)₁₂(spermine)₅-FAM -5' à 2 μ M incubé 4 h ; c) oligonucléotide : 3'-(ADN)₁₂(spermine)₁₁-FAM -5' à 2 μ M incubé 0,5 h. D'après Nothisen et al., 2009.

Les siRNAs cationiques induisent l'ARN interférence *in vitro* quand ils sont incubés avec les cellules en absence de sérum.

Des conjugués ARN-spermine ont été synthétisés, en utilisant le brin sens du siRNA dirigé contre le gène de la luciférase. Les spermines (de 20 à 40 unités) ont été greffées en position 5' du brin sens puis les duplexes de siRNAs ont été formés. Les cellules A549-Luc exprimant stablement le gène de la luciférase ont été utilisées comme modèle *in vitro*. Les siRNAs cationiques spécifiques sont capables d'éteindre l'expression du gène luciférase avec une efficacité dépendante de la concentration. L'extinction est de l'ordre de 90% pour une concentration de 400 nM (Figure 54). Cette activité est comparable à celle obtenue avec de siRNAs standards vectorisés par un lipide cationique commercial (INTERFERin[®], Polyplus-

transfection). A des concentrations identiques, les siRNAs standard non vectorisés n'ont aucun effet car ils ne pénètrent pas dans les cellules. Les siRNAs cationiques non spécifiques à 400 nM n'ont aucun effet sur le gène cible.

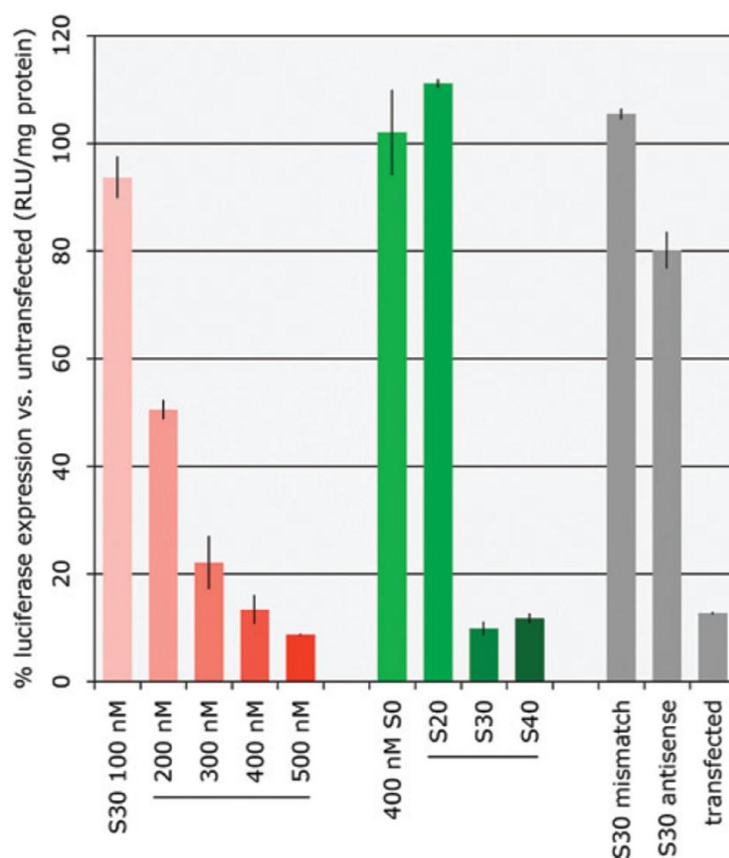


Figure 54 : Extinction du gène de la luciférase dans les cellules A549Luc en utilisant des conjugués siRNAs cationiques. L'extinction du gène cible augmente avec la concentration (barres rouges) et le nombre d'unités cationiques de spermine greffées sur l'oligonucléotide ARN (barres vertes). Les barres grises sont les contrôles positifs et négatifs. D'après Nothisen et al, 2009.

C. NOTRE PROJET.

Comme je l'ai brièvement décrit précédemment, les travaux antérieurs à cette thèse ont clairement montré l'intérêt de greffer une queue polycationique sur un oligonucléotide. Les premiers résultats des études thermodynamiques ont montré que les unités spermines cationiques permettent de diminuer les répulsions électrostatiques favorisant ainsi la formation du duplexe. Dans la continuité de ces études, nous avons développé deux axes de recherches au cours de cette thèse.

Le premier axe a été dédié au domaine du diagnostic. Notre travail a consisté à démontrer l'intérêt des conjugués oligonucléotides-oligospermine pour leur utilisation en PCR. Les conjugués oligonucléotide-oligospermine utilisés pour le domaine d'application du diagnostic sont de charge globale négative, nous les avons nommés ZNA pour « Zip Nucleic Acid ». Lors de cette thèse, le but a été de démontrer que les amorces ZNA utilisées en PCR et en RT-qPCR permettaient d'augmenter la vitesse d'hybridation tout en restant spécifiques

de la séquence cible. Les amorces ZNA ont été comparées aux autres modifications chimiques permettant d'améliorer la vitesse d'hybridation des amorces. Des essais ont également été réalisés pour évaluer l'efficacité et la spécificité des sondes d'hydrolyse ZNA doublement marquées en PCR.

Le second axe de recherche de cette thèse concernait le domaine d'application thérapeutique par la voie ARN interférence de nos conjugués oligonucléotide-oligospermine. Pour ce domaine d'application les conjugués ARN avec une queue polycationique de spermines sont de charge globale positive et nous les avons nommés SIRNAPLUS. Nos travaux ont consisté à étudier l'activité *in vitro* puis *in vivo* des SIRNAPLUS, plus précisément à montrer l'influence de la charge globale sur l'activité biologique. Des essais ont également été effectués pour montrer la résistance des SIRNAPLUS en présence de sérum. Nous avons également montré que les SIRNAPLUS sont complètement solubles et à l'état moléculaire en solution.

Pour pouvoir réaliser ces essais biologiques, l'essentiel de mon travail de thèse a été dédié au développement de la synthèse et de la purification de ces conjugués oligonucléotide-oligospermine. J'ai effectué des tests visant à améliorer les rendements de synthèse, la purification et la caractérisation des SIRNAPLUS, le but majeur était d'obtenir des conditions de synthèse qui permettent d'obtenir des SIRNAPLUS monodisperses, en grande quantité pour les études *in vivo*. Aussi, pour nous l'attrait majeur d'utiliser les SIRNAPLUS *in vivo*, est que contrairement aux complexes cationiques « classiques » utilisés pour transfecter les siRNAs sous la forme de particules, les SIRNAPLUS eux sont censés former des molécules qui auront l'avantage de leur petite taille pour mieux diffuser dans les tissus. Nous avons donc évalué la taille de siRNA en solution par microscopie et « Dynamic Light Scattering ».

CHAPITRE 4 : LES CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDE-SPERMINE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE.

A. INTRODUCTION.

Les études physico-chimiques des conjugués oligodésoxyribonucléotide-spermine, mentionnées dans le Chapitre 3, ont montré qu'ils forment des duplexes avec une séquence complémentaire d'une très grande stabilité. Ils sont également capables de remplacer de façon strictement complémentaire le brin d'un duplexe naturel, la partie oligocationique ajoutée à l'extrémité de l'oligonucléotide spécifique n'interférant pas avec la capacité d'hybridation sélective. Ces ZNAs forment des duplexes caractérisés par des températures de fusion (T_m) augmentées par rapport aux mêmes duplexes non cationiques et dont la T_m est prédictible en fonction de la séquence, de la longueur et du nombre de spermines greffées (Figure 55). Ces propriétés en font donc potentiellement des outils plus puissants pour l'hybridation moléculaire des acides nucléiques que les oligonucléotides utilisés actuellement, sans perte de la sélectivité d'hybridation. La partie oligocationique des conjugués offre également des possibilités de greffage chimique de marqueurs (fluorophores, chromophores, biotine, ...) *via* les fonctions amines, ou encore de fixation à des supports.

Dans ce contexte, notre objectif a été de démontrer le potentiel des ZNAs pour l'hybridation moléculaire d'acides nucléiques et de valider leurs applications dans les technologies d'amplification d'acides nucléiques (PCR et techniques dérivées).

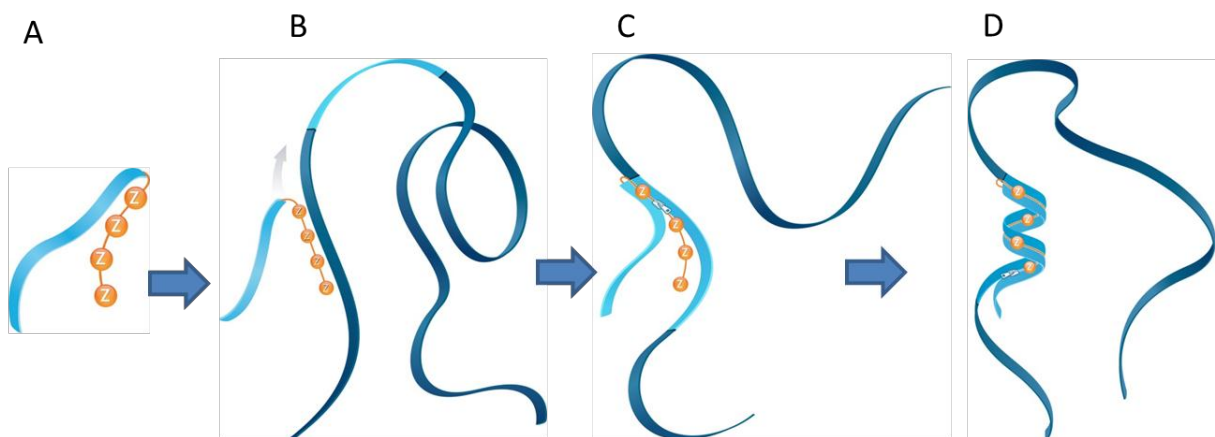


Figure 55 : Schéma d'hybridation des ZNAs. A : Le conjugué ZNA avec son domaine cationique (en orange) ; B : Le ZNA attiré par le brin ADN glisse le long pour chercher sa séquence cible ; C : Le ZNA reconnaît sa séquence cible ; D : Une fois reconnu le ZNA s'hybride à sa séquence cible et l'hybridation est stabilisée.

Pour cela, nous avons synthétisé des amorces et des sondes d'hydrolyse modifiées ZNA pour la PCR. Dans ce chapitre, je présenterai la synthèse des ZNAs, leur purification et les techniques analytiques utilisées pour les caractériser. Etant donné les conditions de température élevée en PCR, nous avons étudié également la stabilité chimique des ZNAs.

Ces études ont révélé une possible instabilité des ZNAs à haute température, ce qui nous a conduit à développer un synthon phosphoramidite plus stable. Enfin, l'application des ZNAs en PCR sera décrite et discutée au travers des deux articles publiés dans le journal « Nucleic Acid Research ».

B. LA CHIMIE DES CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDE-SPERMINE.

1. Synthèse, déprotection et purification des conjugués ARN-oligospermine.

Depuis la démocratisation des synthétiseurs automatiques d'oligonucléotides dans les années 1990, il est plus aisé de réaliser la synthèse d'oligonucléotides directement dans les laboratoires.

La chimie des phosphoramidites utilisée pour le couplage des nucléotides est très efficace et permet en routine d'obtenir des rendements de couplage supérieurs à 99% pour les amidites ADN et supérieurs à 98% pour les amidites ARN. Au Laboratoire, le synthon spermine phosphoramidite a été développé pour y être introduit dans la chimie automatisée des oligonucléotides et ainsi pour pouvoir être ajouté à façon à une séquence d'oligonucléotide.

Les ZNAs sont des oligonucléotides ADN sur lesquels sont greffés 4 à 6 unités de spermine. Leur synthèse se fait en suivant le cycle standard de synthèse des phosphoramidites ([Figure 56](#)). Dans un premier temps, la partie ADN est élonguée (15-25-mère), puis ensuite sont ajoutées les spermines. La synthèse de la partie oligonucléotidique des ZNAs se fait sans difficulté majeure, seule l'élongation avec des spermines peut être plus compliquée.

Etant donné que les bases ADN sont ajoutées avec un rendement de couplage proche de 99% à chaque étape, la pureté finale des conjugués ZNAs est directement liée au rendement de couplage des quelques unités de spermine finales. Pour les unités de spermine les rendements de couplage étaient compris entre 93 et 96%, ce qui représente un faible rendement de couplage. Cependant, l'objectif était d'introduire un faible nombre de spermines par oligonucléotide car dans le cas de l'application visée, les oligonucléotides ne sont pas longs et d'après les études de T_m , un faible nombre de spermines est suffisant pour obtenir une augmentation significative de leur T_m . Nous avons donc considéré ce rendement de couplage suffisant, car le conjugué attendu serait ensuite purifié avant son utilisation.

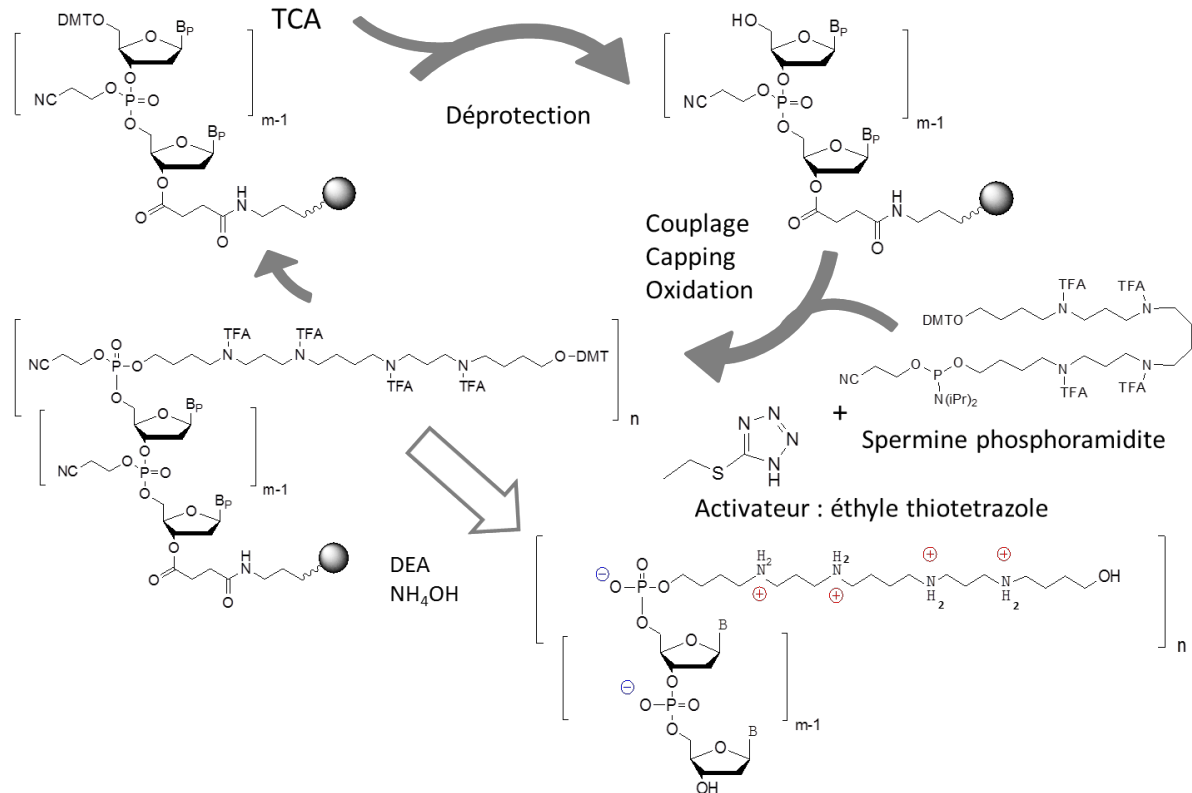


Figure 56 : Cycle d'introduction de la spermine phosphoramidite sur un oligonucléotide.

Après leur synthèse, les ZNAs sont clivés de leur support solide en même temps qu'ils sont déprotégés. Habituellement, les protections des nucléobases des amidites (Figure 57) standard peuvent être clivées en chauffant les oligonucléotides pendant 16 h à 55°C dans de l'ammoniaque concentrée. Pour éviter de soumettre la spermine aux conditions drastiques de la déprotection des nucléobases standard, nous avons utilisé des amidites portant des nucléobases avec des protections dites « UltraMild » (Figure 57). Les protections « UltraMild » sont beaucoup moins utilisées mais elles permettent d'employer des conditions plus douces de déprotection. Habituellement, une incubation de 2 h à température ambiante dans de l'ammoniaque concentrée est suffisante pour déprotéger un oligonucléotide de type « UltraMild ». Cependant, dans le cas des ZNAs, une nuit à température ambiante est nécessaire pour déprotéger à la fois les nucléobases et les unités spermines.

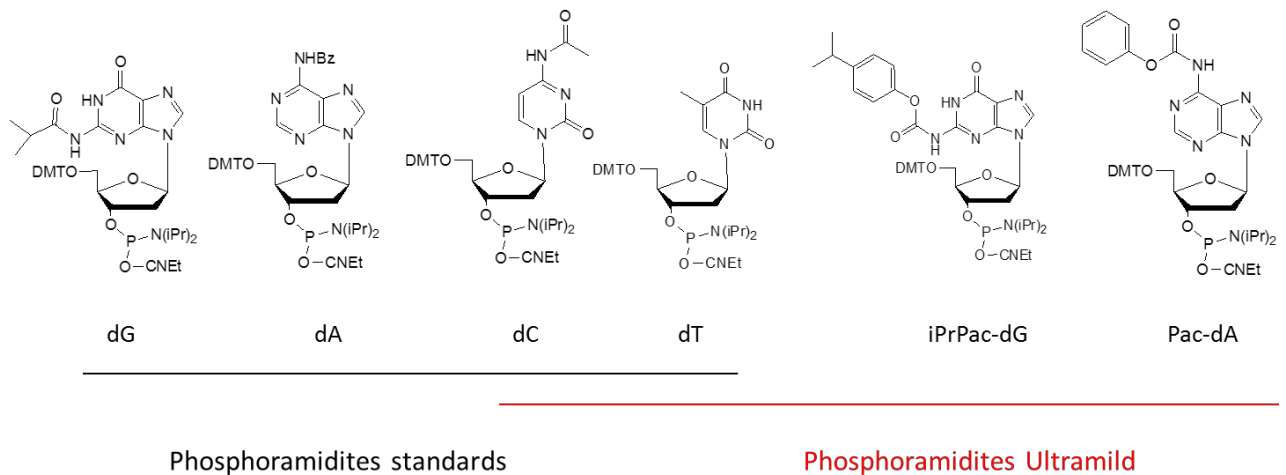


Figure 57 : Amidites standard et amidites "UltraMild". Il faut 8 h à 65°C dans NH₄OH pour déprotéger les nucléobases des amidites standard. Il faut 2 h à température ambiante pour déprotéger les nucléobases des amidites «UltraMild». Les conditions de déprotection «UltraMild» sont beaucoup plus douces.

Après avoir clivé les ZNAs de leur support solide, ils sont purifiés rapidement sur des cartouches commerciales en phase inverse C₁₈ PolyPack II (Glen Research). La purification sur cartouche de C₁₈ est basée des interactions hydrophobes entre le groupement protecteur hydrophobe diméthoxytrityle (DMT) et la phase inverse C₁₈. En effet une fois que le ZNA est accroché à la phase inverse, ce dernier terminé avec un DMT peut être séparé des avortons de synthèse par simple rinçage. Les ZNAs sont ensuite décrochés de la phase inverse en clivant le groupement DMT final pour être ensuite élués et collectés. La purification sur cartouche C₁₈ prend environ 20 min et elle permet d'obtenir des ZNAs avec une pureté d'environ 80% mais qui ne nuit pas à leur utilisation en PCR.

Nous allons voir dans le chapitre suivant que lorsque les conjugués oligonucléotide-oligospermine sont utilisés pour leur application en thérapie, leur purification est beaucoup moins simple puisque nous avons à travailler avec des conjugués, de charge globale positive, beaucoup plus longs et donc beaucoup plus polydisperses. Dans ce cas la pureté finale n'est plus uniquement due à la purification finale des conjugués mais également à l'efficacité de couplage des unités de spermine phosphoramidite.

2. Analyses des conjugués oligonucléotide-oligospermine.

Les premières tentatives effectuées au laboratoire pour analyser les ZNAs en HPLC sur une colonne de phase inverse (RP-HPLC) n'ont pas été concluants. Les résultats ont montré qu'il n'était pas possible d'élué des ZNAs qui portaient plus de deux unités de spermine. Nous nous sommes donc tourné vers l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anion (IEX-HPLC) dont la séparation est basée sur les interactions entre les charges négatives des

groupements phosphates des oligonucléotides et les charges positives des groupements ammoniums quaternaires portés par la colonne.

Les ZNAs sont des zwitterions, c'est-à-dire qu'ils sont à la fois chargés positivement et négativement. Pour pouvoir les analyser sur une colonne échangeuse d'anions il faut que les charges positives soient masquées pour éviter les répulsions avec les charges positives de la colonne. Pour cela nous nous sommes placés dans des conditions d'analyse basique proches de pH=11 pour pouvoir éteindre au maximum les charges positives de la partie cationique. Les ZNAs sont élués avec un gradient en chlorure de sodium 1 M.

Les essais ont montré qu'il était possible d'analyser les ZNAs sur une colonne échangeuse d'anions, mais nous avons remarqué que le comportement des ZNAs sur la colonne n'était pas en adéquation avec la théorie. En effet, si l'on part du principe qu'à chaque unité spermine ajoutée on additionne sur l'oligonucléotide un groupement phosphate chargé négativement, alors le temps de rétention doit augmenter avec le nombre d'unités de spermine ajoutée sur l'oligonucléotide (Figure 58 A), dans les conditions où les amines de la spermine ne sont pas chargées. Cependant c'est l'inverse qui est observé, plus on ajoute de spermines et plus le temps de rétention diminue (Figure 58 B). Notre hypothèse est que l'encombrement stérique induit par les unités de spermine réduit les interactions ioniques avec la colonne et diminue le temps de rétention.

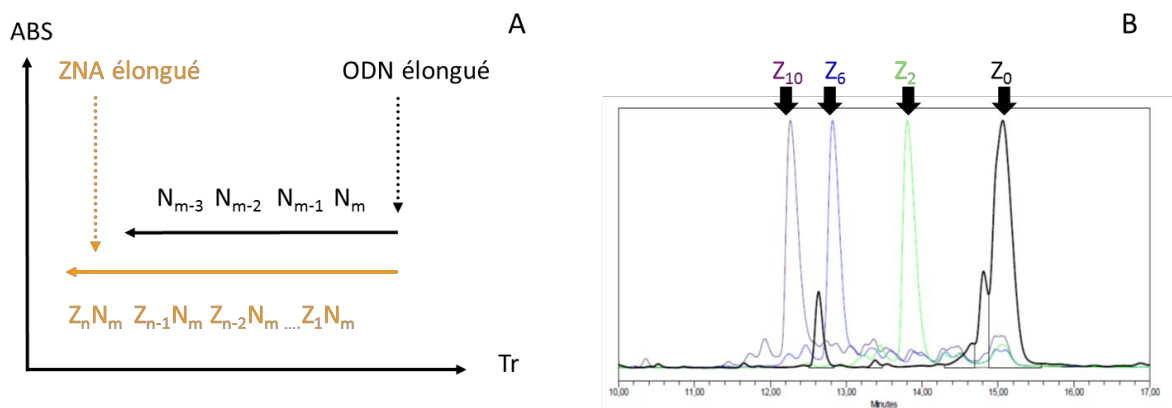


Figure 58 : Analyse-purification et comportement des conjugués oligonucléotide-oligospermine en IEX-HPLC. A : comportement des oligonucléotides (ODN) et des ZNAs en IEX-HPLC : en théorie le temps de rétention des ZNAs doit augmenter quand le nombre de spermines greffées augmente mais en pratique il se produit l'inverse. B : Plus on ajoute de spermines sur un oligonucléotide ADN de 22-mère et plus le temps de rétention diminue.

Comme indiqué précédemment, dans la pratique les cartouches C₁₈ PolyPack II permettent l'élimination des impuretés majeures (Figure 59 a et b). Cependant, on remarque en comparant les chromatogrammes d'un ZNA de séquence Z₄ADN₁₇ brut et d'un ZNA de séquence Z₄ADN₁₇ purifié que le pic correspondant à une impureté majeure disparaît sur le chromatogramme du composé pur. Cependant la pureté obtenue pour le ZNA est proche de 80%, et le chromatogramme montre la présence d'impuretés au pied du pic principal correspondant au ZNA totalement élongué. Ces impuretés ne peuvent pas être éliminées en purifiant les ZNAs sur cartouche de C₁₈, mais nous avons décidé que ce degré de pureté était suffisant pour l'utilisation des ZNAs en PCR car il est similaire au degré de pureté des oligonucléotides commerciaux utilisés dans ce domaine.

Pour être certain de la séquence des ZNAs produits, nous les analysons soit par spectrométrie de masse Esi-Tof ou Maldi-Tof en utilisant l'acide hydroxypicolinique comme matrice (Figure 59 c). Les spectres de masses des ZNAs nous ont également permis de mettre en évidence la présence d'adduits cyanoéthyles sur les conjugués. Ces adduits sont issus des groupements protecteurs des phosphates, qui une fois libérés lors de la déprotection en milieu basique, viennent réagir préférentiellement sur les amines des thymines et potentiellement sur les spermines. Pour limiter la présence de ces adduits nous avons essayé d'introduire des «scavengers» dans la solution de déprotection tel que le nitrométhane (3% nitrométhane dans NH_4OH), ou encore le diéthylmalonate (3% diéthylmalonate/15% éthanol dans NH_4OH). Mais c'est finalement le traitement avec de la diéthylamine des ZNAs sur le support solide avant de les décrocher qui s'est révélé être la solution la plus efficace pour éviter la formation d'adduits cyanoéthyles. Les ZNAs sont donc traités directement sur le support solide avec une solution de diéthylamine à 20% dans de l'acétonitrile durant 20 min en flux continu.

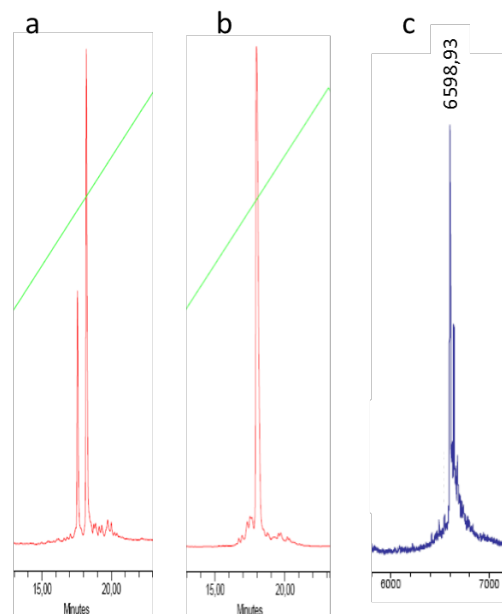


Figure 59 : Analyses d'amorces de PCR $Z_4 \text{ADN}_{17}$. Conditions HPLC : éluant A : NH_4OH 0,1 M + 10% ACN ; éluant B : A + NaCl 1 M, 35°C, 0 à 100% de B en 23 min, colonne DNAPac PA 100 ; a) analyse du conjugué $Z_4 \text{ADN}_{17}$ brut ; b) analyse du conjugué $Z_4 \text{ADN}_{17}$ purifié ; c) analyse Maldi-Tof, avec l'acide hydroxypicolinique utilisé comme matrice.

3. Etude de stabilité des ZNAs.

Les ZNAs comportent peu d'unités cationiques et visent principalement à être utilisés comme amorces de PCR. La réaction de polymérase en chaîne (PCR) consiste à amplifier quelques copies d'un brin d'ADN en millions de copies. Pour cela, comme il est décrit dans le premier chapitre, des cycles de chauffage de l'échantillon sont effectués pour permettre la séparation des brins de la double hélice et permettre leur réplication par la polymérase en présence d'amorces. Ces cycles de chauffage consécutifs peuvent avoir un effet sur la stabilité chimique de nos amorces ZNAs. Des essais ont été réalisés pour évaluer leur stabilité dans les conditions de PCR, les amorces ZNAs ont été incubées durant 90 min à 90°C dans du tampon Tris-EDTA (10 mM ; 1 mM) à pH=8. Les chromatogrammes montrent que

pour une amorce de 23 nucléotides sur laquelle sont greffées 5 unités de spermine, aucune dégradation n'apparaît après une incubation de 90 min ([Figure 60 A](#)). Lors d'un cycle de PCR un plateau de température à 90°C est nécessaire à la séparation des duplexes, il ne dure que 20 s au maximum. Pour une réaction d'amplification, ce plateau de température est atteint entre 25 et 35 fois. Cela signifie donc qu'il est possible d'effectuer au moins 270 cycles avec des plateaux de 20 s à 90°C avec une amorce ZNA. Nous montrons donc ainsi que les ZNAs sont stables dans les conditions de PCR.

Nous avons rencontré plusieurs fois des problèmes de remise en solution de nos conjugués ZNA dans l'H₂O RNase free après leur concentration à sec au «speed-vac». Les ZNAs n'étaient pas totalement solubles dans l'eau, nous avons donc dû les reprendre dans une solution aqueuse d'ammoniaque à 50 mM, nous avons ensuite vérifié leur stabilité dans cette dernière solution de reprise.

Pour cela, un ZNA composé de 23 bases ADN et de 3 unités de spermine a été incubé dans une solution aqueuse d'ammoniaque à 50 mM durant 90 min à 90°C. Les résultats montrent qu'un début de dégradation apparaît après 30 min d'incubation, ce qui prouve que les ZNAs se dégradent partiellement en milieu basique ([Figure 60 B](#)). Reprendre et stocker les ZNA dans une solution de NH₄OH 50 mM ne semble donc pas être la solution idéale, mais en procédant ainsi, il est possible de solubiliser totalement les ZNAs à condition qu'ils soient mis en solution juste avant leur utilisation. Une des solutions envisagée était de reprendre les ZNAs dans NH₄OH 50 mM puis de les diluer dans du tampon TE à pH = 7.4 (Tris 0,01 M ; EDTA 0,001 M) pour pouvoir les conserver plus longtemps à -20°C.

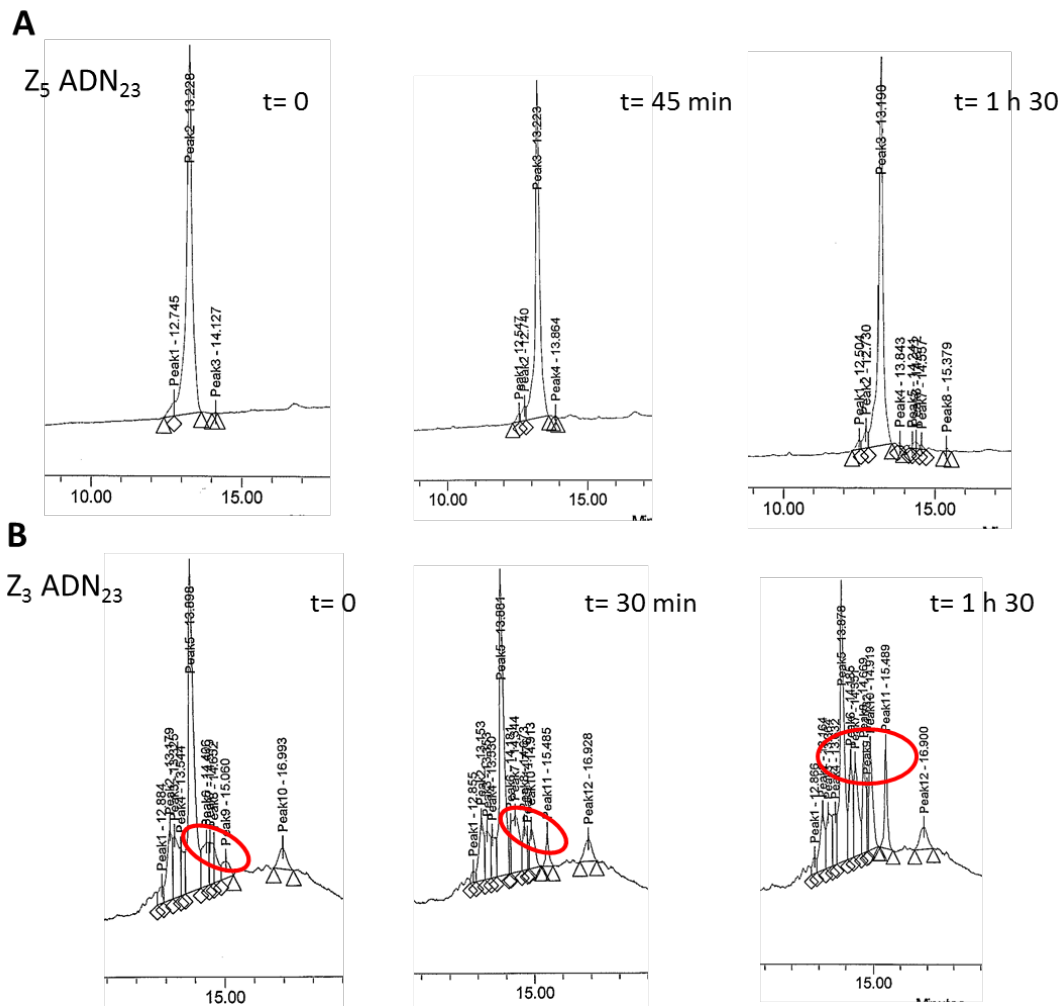


Figure 60 : Etude de stabilité des amorces PCR dans les conditions extrêmes de température de PCR. A : incubation dans du Tris-EDTA (10/1 mM), pH=8 à 90°C ; B : incubation dans NH₄OH 50 mM (solution de reprise des ZNA après lyophilisation) à 90°C.

Lors des essais de stabilité des ZNAs dans l'ammoniaque 50 mM nous avons observé une dégradation qui se manifeste sur les chromatogrammes par l'apparition de pics dédoublés qui s'accroît avec le temps (Figure 60 B). Si on considère les chromatogrammes de l'oligonucléotide Z_3 ADN₂₃ qui comporte seulement 3 spermines on remarque qu'après 1 h 30 min d'incubation, 5 pics apparaissent avec des temps de rétention supérieurs à celui du pic majoritaire. Théoriquement, si les unités de spermine se sont dégradées, nous sommes censés avoir trois pics après le pic majoritaire : le pic du conjugué sans spermine Z_0 avec le temps de rétention le plus élevé, ainsi que les deux pics intermédiaires des conjugués avec une et deux spermines Z_1 et Z_2 .

Notre hypothèse, pour expliquer que les pics des composés Z_1 et Z_2 sont dédoublés, est que la dégradation des unités de spermine se fait de part et d'autre du groupement phosphate des liens inter-spermine. Par conséquent, statistiquement le groupement phosphate a autant de chance de rester accroché au conjugué que d'en être clivé. C'est pour cette raison que les pics des composés issus de la dégradation Z_1 et Z_2 sont dédoublés. Celui des 2 pics qui a le plus grand temps de rétention, correspond au pic du conjugué dont le groupement phosphate provenant de la phosphospermine est encore accroché.

Pour illustrer ce phénomène de pics dédoublés lié à la dégradation, nous avons étudié la stabilité d'un conjugué oligonucléotide-oligospermine modèle $Z_{10}T_{10}$ en milieu basique. Nous avons choisi ce conjugué modèle, car les thymines n'ont pas de groupements protecteurs à déprotéger et que par conséquent, les essais de stabilité réalisés permettent de se focaliser sur la partie oligospermine du conjugué modèle.

Le conjugué $Z_{10}T_{10}$ a été incubé dans de l'ammoniaque concentré à 65°C pendant 6,5 h. Les chromatogrammes de la solution de déprotection aux temps 30 min, 1 h, 5 h et 6,5 h d'incubation montrent que la dégradation des unités de spermine augmente avec le temps d'incubation et devient très importante après 1 h d'incubation ([Figure 61 A](#)). On observe également sur ces chromatogrammes que les pics des composés issus de la dégradation correspondants aux composés Z_1T_{10} à Z_5T_{10} sont dédoublés, ce qui semble étayer l'hypothèse que le clivage des unités de spermine se fait de part et d'autre du groupement phosphate. On remarque également que la colonne échangeuse d'anions perd sa résolution quand le conjugué contient plus de 5 spermines, les doubles pics ne sont plus résolus. La colonne perd complètement son pouvoir résolutif pour les conjugués portant 9 et 10 spermines.

La dégradation des unités de spermine a également été observée sur gel d'électrophorèse ([Figure 61 B](#)). Une sonde d'hydrolyse ZNA portant une séquence constituée, de bases ADN, de quelques unités de spermine, d'un fluorophore et d'un « quencher » : FAM- Z_4 -ADN₂₂-BHQ₁ (FAM : fluorescéine ; BHQ1 : Black Hole Quencher 1) a été incubée dans une solution de Tris à 50 mM à 65°C à différents pH. Les résultats montrent que la dégradation se fait en fonction du temps et du pH ([Figure 61 B](#)).

Les bandes des sondes ZNAs incubées 4 h à 65°C de pH 7,5 à 10,2 ne montrent aucune dégradation, en comparaison aux bandes contrôles des sondes non incubées. En revanche, lorsque les sondes ZNAs sont incubées durant 1 journée à 65°C, à des pH de 8,6, 9 et 10,2, une multitude de bandes en dessous de la bande principale sont observées ce qui révèle une dégradation.

Les sondes d'hydrolyses FAM- Z_4 -ADN₂₂-BHQ₁ ne sont pas stables dans le temps à pH basique, les chromatogrammes des conjugués oligonucléotide-oligospermine $Z_{10}T_{10}$ incubés dans des conditions basiques montrent que les pics des produits de dégradation sont dédoublés et notre hypothèse est que la dégradation des unités de phosphospermine se fait de part et d'autre du groupement phosphate de la spermine.

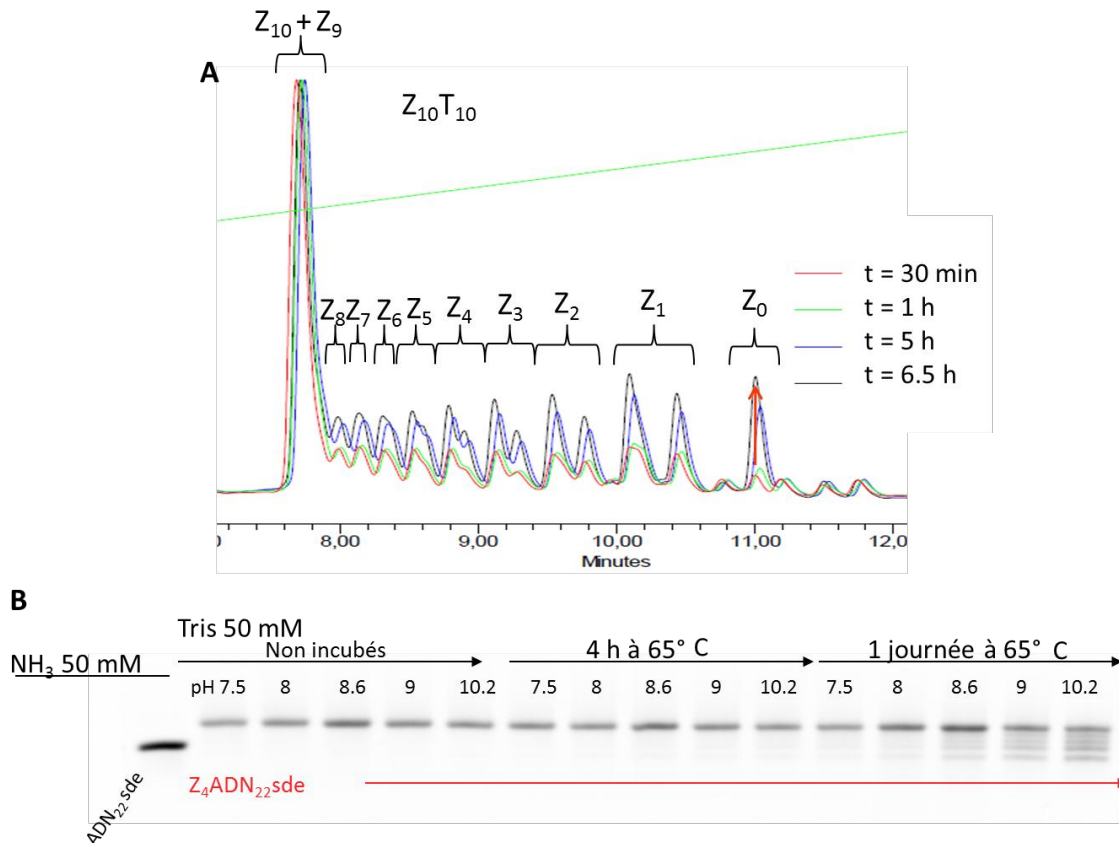


Figure 61 : Etude de la stabilité des amorces de PCR ZNA dans les conditions de déprotection rapide «UltraMild». A : le ZNA $Z_{10}T_{10}$ est incubé 1 h à température ambiante dans NH_4OH concentré pour être clivé du support solide puis il est incubé 30 min, 1 h, 5 h ou 6,5 h dans NH_4OH à 65°C. Le dédoublement des pics montre une dégradation des unités de spermine. La dégradation devient importante après 1 h d'incubation (chromatogramme vert). B : Etude de stabilité des sondes d'hydrolyse ZNA en fonction du pH et du temps d'incubation. Lorsque les sondes sont incubées pendant une journée à 65°C aux pH 8,6, 9 et 10,2, elles se dégradent.

4. Stabilité et structure du synthon spermine.

L'enchaînement des unités de phosphospermine greffées sur l'oligonucléotide forme des structures qui sont symétriques de part et d'autre du groupement phosphate inter-spermine qui les relie (Figure 62). De part et d'autre de ce groupement phosphate se trouve un motif butylamine. Les chromatogrammes de l'étude de stabilité précédente suggère l'hypothèse que la dégradation des unités spermines induit une coupure de part et d'autre du groupement phosphate.

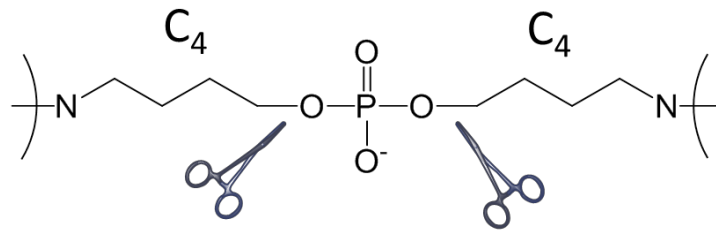


Figure 62 : Structure symétrique du lien phosphate inter-spermine.

Wilk et ses collègues ont montré que le groupement 4-[N-méthyl-N-(2,2,2-trifluoroacetyl)amino]butyle pouvait être utilisé comme alternative au groupement protecteur cyanoéthyle des liens phosphates (Figure 63 A). Le nouveau groupement utilisé comporte également 4 atomes de carbone entre l'oxygène du groupement phosphate et le groupe amino protégé sous forme TFA. La déprotection du lien phosphodiester s'effectue avec de l'ammoniaque concentrée pendant 2 h à 25°C. Le groupement trifluoroacétyle est clivé en présence de NH_4OH pour former le composé trifluoroacétamide (H_2NCOCF_3) et exposant ainsi une fonction amine secondaire. Ensuite le proton acide en position α de l'oxygène du phosphotriester est arraché pour permettre l'attaque nucléophile de l'amine secondaire induisant le clivage du groupement protecteur et permettant la formation de la 1-méthyl pyrrolydine.

Nous pensons que ce mécanisme de dégradation peut s'appliquer à nos conjugués oligonucléotide-oligospermine de part et d'autre du lien phosphate inter-spermine (Figure 63 B). Ce mécanisme permettrait donc d'expliquer notre hypothèse sur la dégradation de la partie oligospermine de nos ZNAs dans des conditions basiques et à hautes températures.

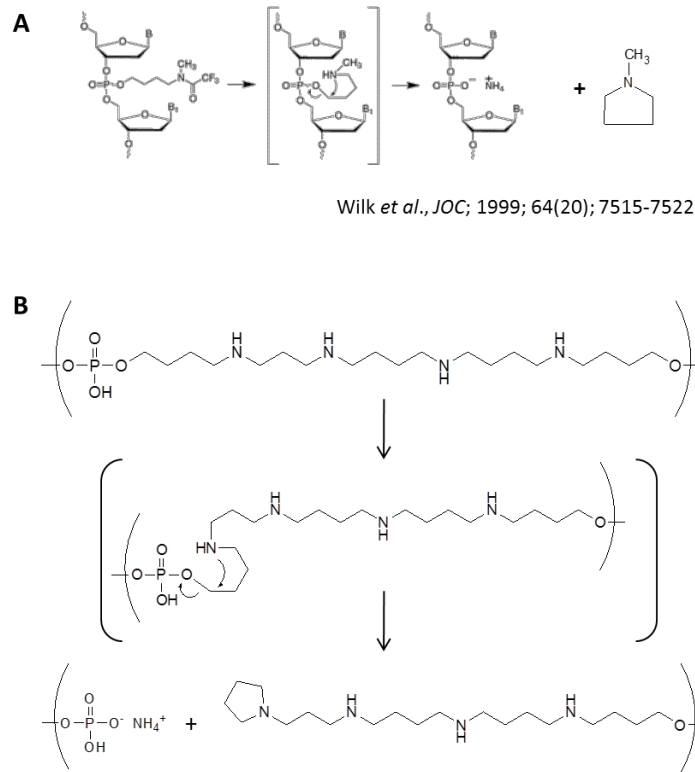


Figure 63 : Mécanisme proposé de dégradation de l'oligophosphospermine. **A :** mécanisme permettant la déprotection du lien phosphate protégé par le groupement 4-[N-Méthyl-N-(2,2,2-trifluoroacetyl)amino]butyl suggérant la dégradation possible des unités de spermine (C_4). La déprotection se fait dans NH_4OH concentré durant 2 h à $25^\circ C$; **B :** Extrapolation du mécanisme de déprotection de la partie oligophosphospermine expliquant la dégradation de celle-ci. Le clivage du lien phosphodiester interspermine peut se faire de part et d'autre du groupement phosphate.

Le synthon spermine que nous utilisons depuis le départ et que nous appelons synthon C_4 , comporte 4 atomes de carbone entre l'oxygène du lien phosphate et le premier atome d'azote de l'unité spermine. Nous venons de voir que ce synthon C_4 n'est pas stable dans des conditions basiques, du fait de ses 4 atomes de carbone de part et d'autres du lien phosphate. Nous avons souhaité confirmer notre hypothèse en étudiant la stabilité d'un conjugué Z_3T_{10} en l'incubant de 1 h à 7,5 h à $65^\circ C$ dans une solution d'ammoniaque concentré. Nous avons suivi la cinétique de dégradation en IEX-HPLC. Au cours du temps, des pics apparaissent alors qu'en proportion l'aire pic du composé initial Z_3T_{10} diminue (**Figure 64 A**). Après 7,5 h d'incubation, les analyses par spectrométrie de masse Esi-Tof confirment la génération des composés avec moins d'unités de spermines avec plus ou moins un groupement phosphate, jusqu'à un composé final de dégradation qui est l'oligonucléotide sans aucune unité de spermine mais avec un groupement phosphate (issu de la première spermine couplée à l'oligonucléotide) (**Figure 64 B**).

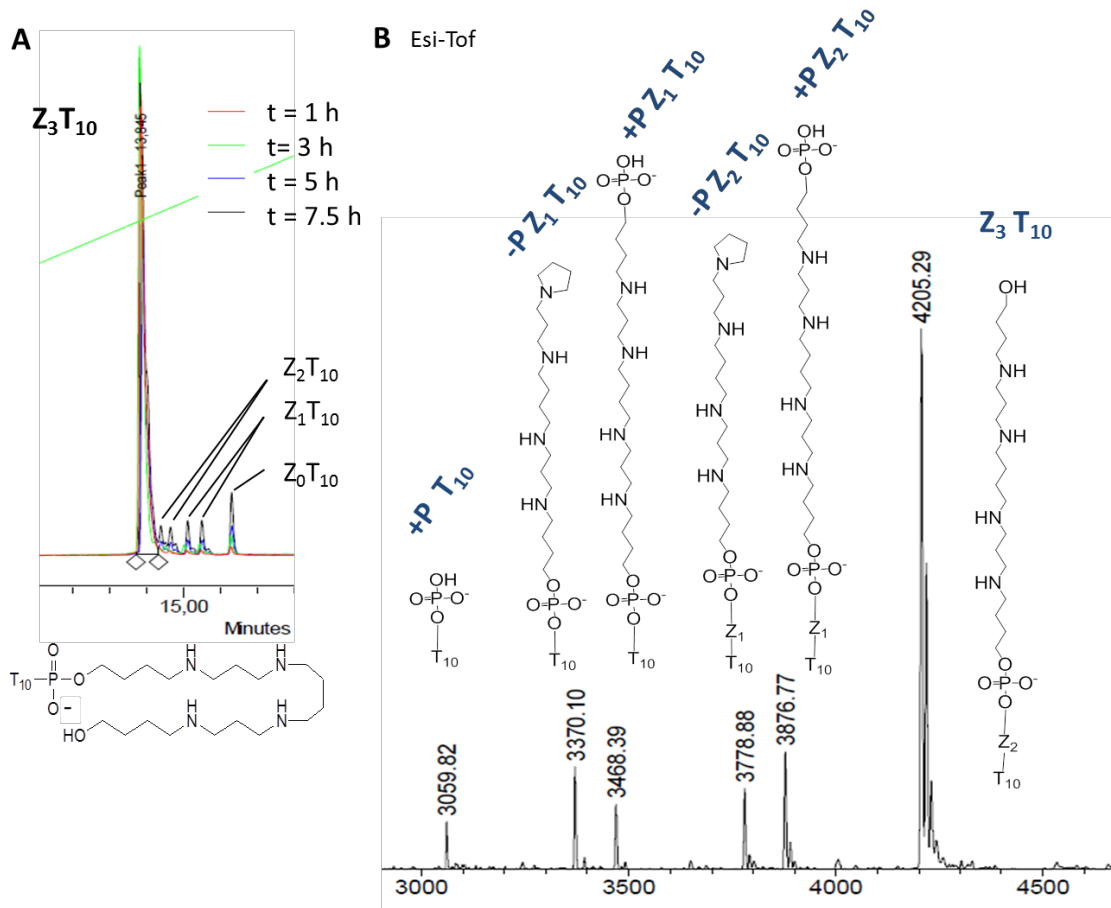


Figure 64 : Etude de stabilité du domaine oligospermine. **A** L'oligonucléotide modèle Z_3T_{10} a été incubé à 65°C jusqu'à 7,5 et il apparaît que la quantité des produits de dégradation augmente au cours du temps. **B** L'analyse Esi-Tof de la condition à 7,5h montre que les produits de dégradation sont bien des conjugués qui ont subi des clivages de part et d'autre des liens phosphates inter-spermines.

Ce résultat nous a amené à étudier l'effet du nombre de carbone entre le phosphate et l'amine du groupe phosphospermine sur la stabilité des conjugués en milieu basique.

Avant de synthétiser des nouveaux synthons phosphoramidite spermine, nous avons utilisé des « amino-linkers » commerciaux contenant 3 et 6 carbones entre l'oxygène du phosphate et le groupe amino (appelés « linkers » C_3 et C_6). Des oligonucléotides T_{10} ont été modifiés avec ces deux amino-linkers, puis leur stabilité a été étudiée dans les conditions basiques, comme précédemment décrit. Contrairement au Z_3T_{10} , le chromatogramme du déca-mère thymidine avec l'« amino-linker » C_6 ne montre pas de dégradation (Figure 65 A), tout comme le déca-mère avec l'« amino-linker » C_3 (Figure 65 B). Notre oligonucléotide T_{10} contrôle ne présente également aucune dégradation lorsqu'il est incubé dans des conditions basiques (Figure 65 C). Ces résultats montrent que, potentiellement, des synthons spermine phosphoramidite avec 3 ou 6 carbones entre le phosphate et l'amine devraient être plus stables que le synthon avec 4 carbones (synthon C_4).

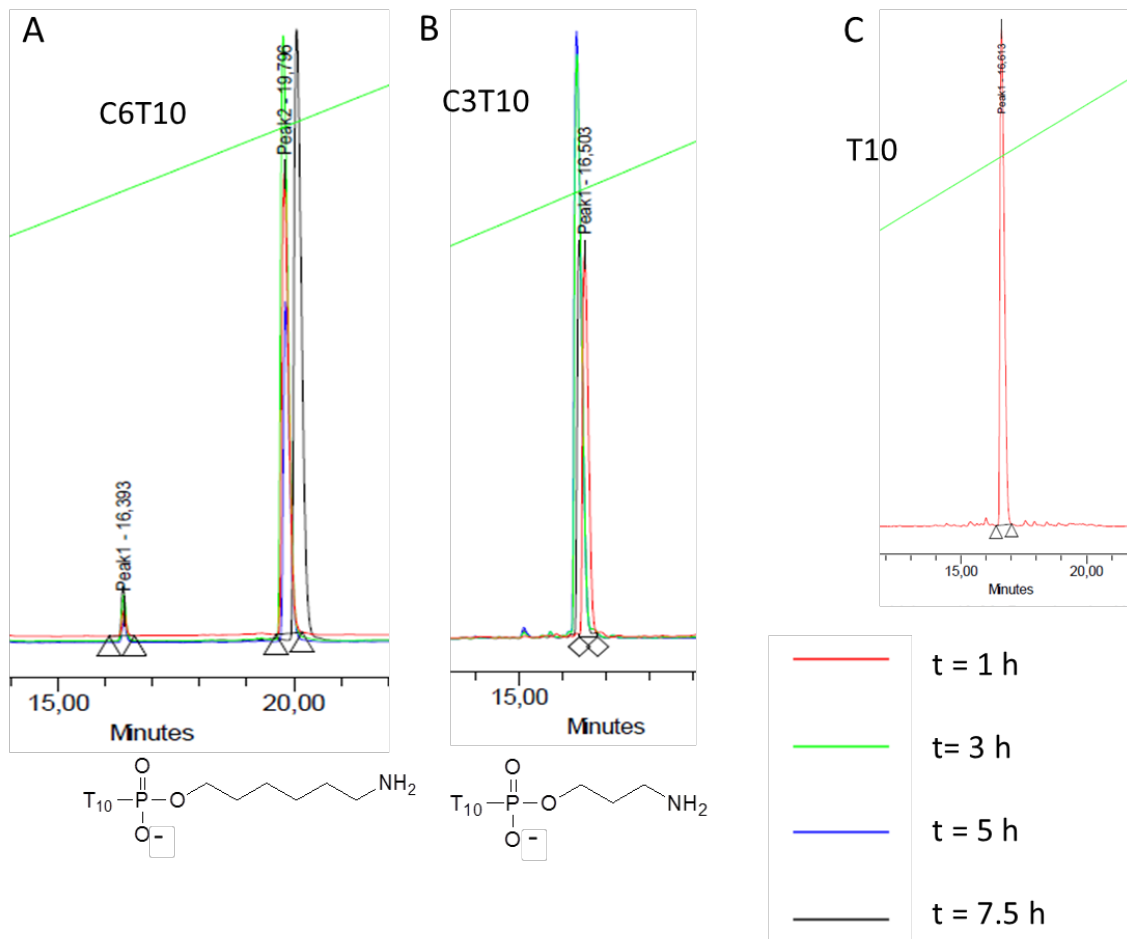


Figure 65 : Stabilité des « amino-linkers » en fonction du nombre de carbones entre le phosphate et l'amine. Des motifs C₆, C₃ entre l'amine et le phosphate sont incubés à 65°C dans NH₄OH concentré pour évaluer leur stabilité. A) T₁₀-amino-linker C₆ : pas de dégradation ; B) T₁₀-amino-linker C₃ : pas de dégradation ; C) oligo contrôle T₁₀ : pas de dégradation.

5. Synthèse du synthon spermine phosphoramidite C₃.

Pour continuer à étudier la stabilité des conjugués oligonucléotide-oligospermine, nous avons choisi de synthétiser le synthon spermine phosphoramidite en C₃ (Figure 66). Le synthon C₃ est supposé être plus résistant que le synthon C₄ dans des conditions très basiques, comme celles de déprotection des ZNAs.

Le synthon spermine phosphoramidite C₃ est synthétisé suivant la même voie de synthèse que le synthon C₄ (voir Figure 50, Chapitre 3). Le dérivé 3-iodo-propanol-1, contenant 3 carbones est introduit à l'étape de bis-alkylation de la spermine, à la place du 4-iodo-butanol-1. Les rendements obtenus à chaque étape sont comparables à ceux obtenus pour le synthon C₄. En ce qui concerne la réactivité du synthon spermine phosphoramidite C₃, les rendements de couplage sont équivalents à ceux du synthon C₄.

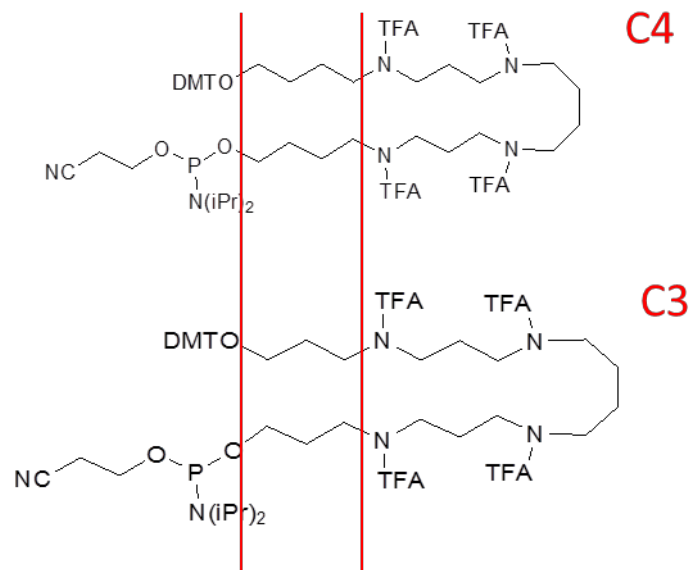


Figure 66 : Différence de structure entre les synthons spermine phosphoramidite C₃ et C₄.

6. Stabilité des ZNAs avec le synthon spermine C₃.

Pour évaluer la stabilité des conjugués ZNAs synthétisés avec le synthon C₃, nous avons synthétisé des conjugués Z₈T₁₀ avec le synthon spermine C₃ et C₄ puis nous les avons incubé dans de l'ammoniaque concentrée à 65°C pendant 24 h (Figure 67). Les tests ont été réalisés à 65°C car c'est à cette température que les nucléobases standards sont déprotégées, normalement pendant 8 h. Le temps d'incubation a été augmenté à 24 h pour forcer la dégradation des composés et observer le comportement des synthons C₄ et C₃ dans ces conditions.

Pour normaliser les aires des pics majoritaires des chromatogrammes, nous avons utilisé un oligonucléotide étalon interne (20-mère thymidine pur à 95%). Pour plus de précision les aires des pics majoritaires ont donc été rapportées à celle de l'étalon interne.

Les chromatogrammes montrent qu'après 8 h d'incubation à 65°C, 52% du Z₈T₁₀ en C₄ ont été dégradé contre seulement 8% du Z₈T₁₀ en C₃. Après 24 h d'incubation, le phénomène s'accroît et 86% du Z₈T₁₀ en C₄ ont été dégradé contre 36% pour le Z₈T₁₀ en C₃, la dégradation est donc presque 2,5 fois plus importante pour le synthon C₄ que le synthon C₃.

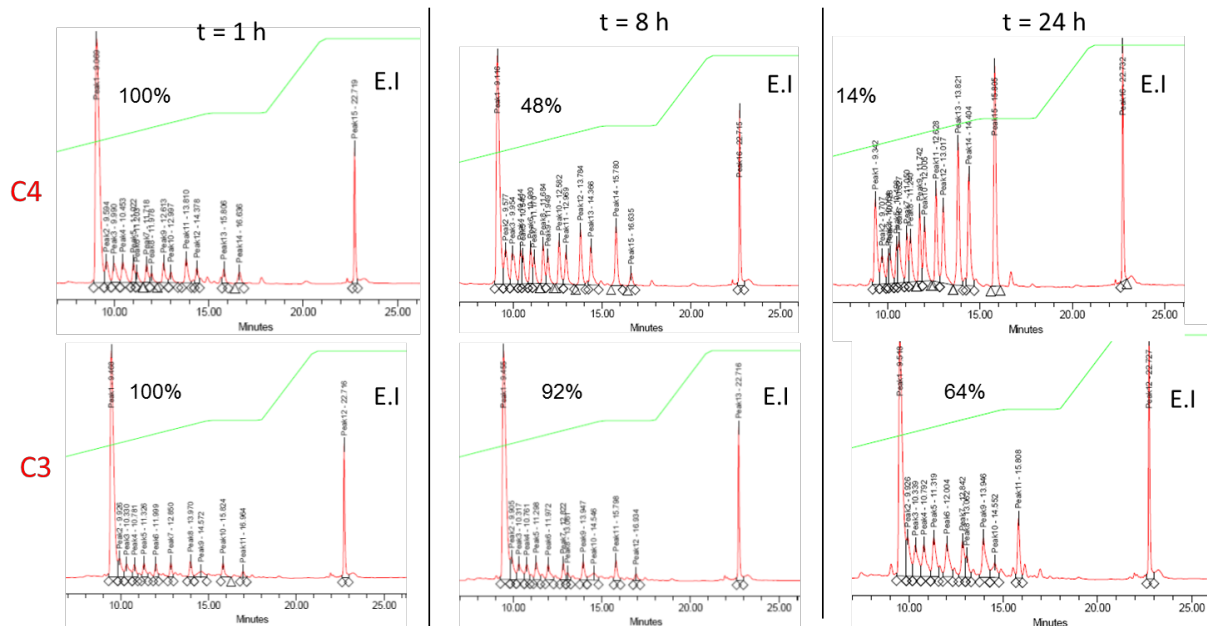


Figure 67 : Etude comparative de la stabilité de conjugués synthétisés avec la spermine phosphoramidite C₃ ou C₄. Les conjugués Z₈T₁₀ en C₄ et C₃ sont incubés à 65°C dans NH₄OH concentré pendant 24 h. Le pourcentage du pic majoritaire (produit Z₈T₁₀) est rapporté à l’aire du pic de l’étalon interne. Le conjugué Z₈T₁₀ est plus stable quand il contient le dérivé en spermine C₃ comparativement à celui en C₄.

Utiliser le synthon spermine C₃ plutôt que C₄ permet aux ZNAs d’être plus stables dans les conditions de déprotection des amidites standards, ce qui signifie que le synthon C₃ peut plus facilement être utilisé industriellement en combinaison avec des amidites standards, ce qui devrait réduire le coût de synthèse en évitant l’usage des bases « UltraMild ».

C. UTILISATION DES AMORCES ZNAs EN PCR.

Notre première publication sur les ZNAs est principalement axée sur leur utilisation comme amorce de PCR en transcription inverse et en PCR quantitative. Le but de cet article était de montrer que le domaine oligocationique permet d’améliorer l’affinité des amorces pour leurs cibles tout en restant discriminant en présence d’un mésappariement. Dans cet article nous avons montré que les amorces ZNAs pouvaient être utilisées avec de faibles concentrations en magnésium et qu’elles sont capables d’être efficaces à des températures élevées d’hybridation. Nous avons également montré que les amorces ZNAs améliorent l’amplification de séquences riches en nucléotides A et T en augmentant la stabilité d’hybridation des amorces sur leurs séquences complémentaires. Le fait de montrer que les amorces ZNAs peuvent être utilisées à des températures d’hybridation élevées peut justifier de leur utilisation en PCR multiplexe (plusieurs séquences amplifiées en même temps).

Le but de ce premier article était également de montrer que le gain d’affinité apporté par les amorces ZNAs peut être utilisé en PCR de transcription inverse pour améliorer les rendements de conversion d’un ARN en ADN complémentaire. Les essais réalisés ont également eu pour but de déterminer l’efficacité des amorces ZNAs pour amplifier les gènes exprimés en faible quantité.

Pour prouver l'intérêt des amorces ZNAs en PCR, elles ont été comparées à d'autres amorces portant d'autres modifications chimiques (LNA, MGB) qui ont également la propriété d'améliorer l'affinité et/ou stabilité des sondes avec leurs séquences cibles.

Published online 20 August 2009

Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 19 e130
doi:10.1093/nar/gkp661

Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription

Valérie Moreau¹, Emilie Voirin¹, Clément Paris¹, Mitsuharu Kotera², Marc Nothisen², Jean-Serge Rémy², Jean-Paul Behr², Patrick Erbacher¹ and Nathalie Lenne-Samuel^{1,*}

¹Polyplus-transfection SA, Bioparc, Boulevard S. Brant, BP90018 and ²LCAMB, CNRS-UdS UMR7199, Laboratoire de Chimie Génétique, B.P.24, 67401 Illkirch, France

Received June 18, 2009; Revised and Accepted July 24, 2009

ABSTRACT

Most nucleic acid-based technologies rely upon sequence recognition between an oligonucleotide and its nucleic acid target. With the aim of improving hybridization by decreasing electrostatic repulsions between the negatively charged strands, novel modified oligonucleotides named Zip nucleic acids (ZNAs) were recently developed. ZNAs are oligonucleotide-oligocation conjugates whose global charge is modulated by the number of cationic spermine moieties grafted on the oligonucleotide. It was demonstrated that the melting temperature of a hybridized ZNA is easily predictable and increases linearly with the length of the oligocation. Furthermore, ZNAs retain the ability to discriminate between a perfect match and a single base-pair-mismatched complementary sequence. Using quantitative PCR, we show here that ZNAs are specific and efficient primers displaying an outstanding affinity toward their genomic target. ZNAs are particularly efficient at low magnesium concentration, low primer concentrations and high annealing temperatures, allowing to improve the amplification in AT-rich sequences and potentially multiplex PCR applications. In reverse transcription experiments, ZNA gene-specific primers improve the yield of cDNA synthesis, thus increasing the accuracy of detection, especially for genes expressed at low levels. Our data suggest that ZNAs exhibit faster binding kinetics than standard and locked nucleic acid-containing primers, which could explain why their target recognition is better for rare targets.

INTRODUCTION

Nucleic acid-based technologies are widely used in research and diagnostics. Such techniques rely upon specific sequence recognition between a synthetic oligonucleotide and its complementary sequence within a nucleic acid strand. PCR-based assays, and particularly qPCR or RT-qPCR are the most commonly used methods for detecting and quantifying genes or their expression (1–3). These powerful techniques need to be carefully implemented to be specific, accurate and sensitive. For several years, scientists in both academia and industry have been devoting their efforts towards facilitating assay design and optimization, decreasing the time of analysis or detecting multiples targets simultaneously in a single reaction or in parallel in a run. In practice, numerous improvements have been made in PCR platforms, laboratory consumables or PCR reagents for this common time-saving goal. Chemistry has also made significant contributions, with the development of probes and modified synthetic oligonucleotides such as minor groove binder (MGB) (4,5) or locked nucleic acid (LNA) modified analogues (6–8). Both types of modifications enhance hybridization, most probably through non-ionic interaction mechanisms (9). Another approach for improving nucleic acid hybridization is to decrease the electrostatic repulsion between negatively charged nucleic acid strands. Peptide nucleic acids (PNAs) are uncharged molecules that have shown a large improvement in hybridization. However, because the backbone is modified, PNA oligomers are not recognized by polymerases (10) and cannot be used as primers in PCR. Based on the same principle of reducing the negative charge of the oligonucleotide, the phosphoramidite-based conjugation of spermine residues to oligonucleotides as cationic units has been recently described

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 90406180; Fax: +33 3 90406181; Email: nlenne@polyplus-transfection.com

© The Author 2009. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(11,12). Oligocation conjugation was shown to favour hybridization with a complementary sequence by clipping the strands together like a zipper (11), hence their name Zip nucleic acids (ZNAs). This stepwise spermine conjugation was indeed shown to raise the T_m in a smooth and linear way, while preserving mismatch discrimination. Base sequence and conjugation site (3' or 5') did not influence the effect on T_m . Rather, it appeared that the melting temperature increase of ZNA brought about by spermine conjugation only depends on the length of the oligonucleotide and on the number of grafted spermines, providing the possibility to predict and finely tune the T_m of any given sequence (13). However, whether the oligospermine moiety does interfere with processing by a DNA polymerase, or whether ZNAs are capable of specific recognition of a target in a whole genome were essential questions to be addressed before considering their use in nucleic acid-based techniques.

In the present study, we show that ZNAs are potent primers for PCR and RT-qPCR, with some distinct advantages over other chemically modified oligonucleotides. Moreover, a comparative evaluation of ZNAs in qPCR provides a better understanding of the mechanism by which ZNAs improve the hybridization.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides

ZNA oligonucleotides were synthesized on a standard oligonucleotide synthesizer as described (11,12), DMT-ON purified on reverse phase cartridge (Poly-Pak II, Glen Research) and characterized on anion-exchange HPLC and ESI-TOF mass spectrometry.

Standard and LNA-containing primers were synthesized and DMT-ON purified by Eurogentec (Seraing, Belgium).

Nucleic acid extraction

Genomic DNA was isolated from SiHa cells (cervical carcinoma, ATCC HTB-35) containing 1–2 integrated copies of HPV16 or HPV-negative A549 cells (lung carcinoma, ATCC CCL-185) using DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Purity and concentration were assessed by agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometry. Aliquots were stored at -20°C and kept at $+4^{\circ}\text{C}$ for short-term use. Total RNA was isolated from HeLa cells (human cervical cancer cell, ATCC CCL-2) or A549 cells using RNA NOW reagent (Biogentex) following manufacturer's instructions. After isopropanol precipitation, RNA was resuspended in RNase-free water and stored at -80°C . RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and A260/280 ratio.

qPCR

All qPCR reactions were performed in a final volume of $10\ \mu\text{l}$ in a Rotor-Gene 6000 instrument (Corbett Lifescience) under the conditions specified in the figure legends. For PCR inter-run comparison, threshold

settings were constant. Amplification of expected product was assessed by melting curve analysis (14).

RT-qPCR

cDNA synthesis was performed using Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen). Total RNA, dNTPs and gene-specific primers were incubated in a $10\ \mu\text{l}$ volume at 65°C for 5 min to denature the RNA and then chilled on ice for at least 1 min. cDNA synthesis mix containing $5\times$ First strand buffer (Invitrogen), dithiothreitol (DTT) and Superscript III was added to RNA/primer mix to a final volume of $20\ \mu\text{l}$ containing: RNA 200 ng, gene-specific primers as indicated, dNTPs $500\ \mu\text{M}$, Tris-HCl $50\ \text{mM}$ pH 8.3, KCl $75\ \text{mM}$, MgCl_2 $3\ \text{mM}$, DTT $5\ \text{mM}$ and SuperScript III RT ($200\ \text{U}$). The reaction was performed at 50°C for 30 min, and heat inactivated at 85°C for 5 min then chilled on ice. In experiments investigating the role of MgCl_2 , magnesium-free $10\times$ RT buffer supplied with SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen) was used for the reverse transcription (RT) reaction, inducing slight modifications as follows: Tris-HCl $20\ \text{mM}$ (pH 8.4), KCl $50\ \text{mM}$, DTT $10\ \text{mM}$, MgCl_2 1.5, 3 or $5\ \text{mM}$. Incubation time was 50 min at 50°C as recommended by the manufacturer.

Subsequent qPCR reactions for HPRT1 and HMGA2 quantifications were performed in Sensimix (Quantace) following cycling conditions: 95°C (15 s) and 60°C (60 s). For probe-based detection, a single-tube format (custom TaqMan gene expression assay, Applied Biosystems) was used (see Table 1 for primers and probes sequence details). For Sybr Green-based qPCR reactions, identical primer pairs (HPRT1F/HPRT1R or HMGA2F/HMGA2R) were used at the concentration of $200\ \text{nM}$ each.

All the studies were performed in accordance with the MIQE guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments) (15).

RESULTS

In order to evaluate the specificity and the performances of ZNAs as PCR primers, we implemented a diagnostic model consisting of detecting the high-risk human papillomavirus type 16 (HPV 16) genome integrated into human genomic DNA. In this model, genomic DNA was extracted from SiHa cells, containing 1–2 copies of viral genome per cell (target genomic DNA); DNA from uninfected human A549 cells was used as negative control. We used two previously described primer pairs (16,17) to amplify the viral E7 oncogene and L1 structural gene. Each primer pair had either 46–48% or 20–30% GC content (Table 1) and thus represented medium- and low-GC content primers, respectively. We synthesized the ZNA primers by conjugating four or five spermines at the 5'-end of the oligonucleotide sequence and compared their performances with those of their standard counterparts (unconjugated DNA primers) and LNA primers containing two LNA nucleotides incorporated near the 5'-end (7,8).

Table 1. Sequence information

Gene	Primer	5'-3' sequences	% GC	T _m ^a	Position	NCBI Accession number
HPV16-E7	DNA-E7F	GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT	45.8	62.1°C	658–681	NM001526
	DNA-E7R	GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA	47.8	61.3°C	816–796	
	Z ₄ -E7F	Z ₄ -GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT				
	Z ₄ -E7R	Z ₄ -GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA				
	LNA-E7F	G+AG GA+G GAG GAT GAA ATA GAT GGT				
	LNA-E7R	GC+C CAT +TAA CAG GTC TTC CAA				
HPV16-L1	DNA-L1F	TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACT AC	30.4	56.4°C	6624–6646	
	DNA-L1R	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	20.0	53.9°C	6741–6765	
	Z _n -L1F	Z _n -TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACT AC				
	Z _n -L1R	Z _n -GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C				
	LNA-L1F	TT+T GTT +ACT GTT GTT GAT ACT AC				
	LNA-L1R	GA+A AAA +TAA ACT GTA AAT CAT ATT C				
HPRT1	HPRT1F	TCCTTGGTCAGGCAGTATAATCCA			Localization	NM000194
	HPRT1R	GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT			Exon6	
	HPRT1probe	FAM-CACCAGCAAGCTTGC-MGBnfq			Exon7	
	Z ₄ -HPRT1R	Z ₄ -GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT			Junction 6–7	
HMGA2 (variant 1)	HMGA2F	CTAGGAAATGGCCACAACAAGTTG			Exon4	NM003483
	HMGA2R	GGCAGACTCTTGTGAGGATGT			Exon5	
	HMGA2probe	FAM-CTGCTCAGGAGGAAAC-MGBnfq			Junction 4–5	
	Z ₄ -HMGA2R	Z ₄ -CTAGGAAATGGCCACAACAAGTTG				

Z_n denotes n spermine units, +N denotes LNA nucleotide.

^aT_m prediction from IDT SciTools web server for 100 nM oligonucleotide and 3 mM MgCl₂. At 1.5 mM MgCl₂, the T_m is predicted to be reduced by 2°C.

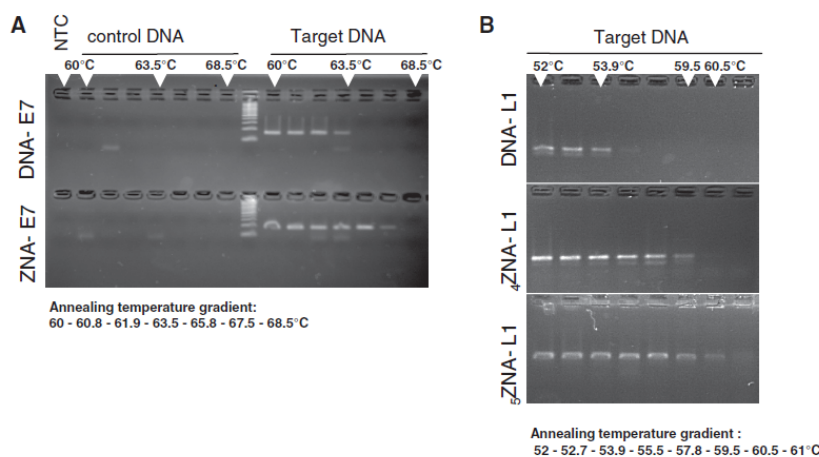


Figure 1. Conventional gradient PCR. Target or control genomic DNA was amplified following an annealing temperature gradient procedure (Bio-Rad iCycler) with DNA-E7 (A, upper lanes) or ZNA-E7 (A, lower lanes) primer pairs (100 nM each); with DNA-L1 (B, upper lanes) or ZNA-L1 primer pair (500 nM each) containing four spermines (B, medium lanes) or five spermines (B, lower lanes). Each sample was amplified in the presence of 10 ng genomic DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 μM dNTP (each) and 0.04 U/μl of EconoTaq DNA Polymerase (Lucigen). Cycling protocol was 94°C (20 s), annealing (20 s), 72°C (15 s) × 35 cycles (A) or 30 cycles (B). Final reactions were analysed on 4% agarose gel (Seakem LE, Cambrex) stained with ethidium bromide.

Gradient PCR

We first evaluated ZNA primers by conventional PCR using a gradient PCR procedure. ZNA oligonucleotides were able to prime DNA synthesis and drive PCR

amplification indicating that the oligospermine tail located at the 5'-end does not impede the polymerase (Figure 1). PCR products of the expected size (Figure 1A, 159 bp for E7 gene; Figure 1B, 142 bp for L1 target) were exclusively amplified from target template (genomic DNA from

SiHa cells versus non-infected A549 cells), showing that amplifications using ZNAs are specific. We confirmed amplicons identity by DNA sequencing. ZNAs enable the annealing step to be carried out at higher temperature compared with standard DNA primers, up to +4°C for both E7 and L1 primers conjugated to four spermines. This stabilization was further increased with five spermine moieties (Figure 1B) confirming that T_m is modulated by the number of spermine units grafted onto the oligonucleotide (11,13). No PCR product was detected using control genomic DNA even at the lowest temperature, except for some primer-dimers also occurring using unconjugated primers. This indicates that ZNA primers stabilize hybridization without affecting specificity. Moreover, the addition of spermine units stabilizes both E7 and L1 sequences in the same extent, while variability is observed for LNA modifications (Figure 1 and Supplementary figure).

PCR optimization, efficiency and sensitivity

To further characterize ZNAs as PCR primers, qPCR using SYBR Green detection was implemented to evaluate both the specificity and the efficiency of PCR. PCR efficiency depends on the binding efficiency of both primers to their target sequence. As magnesium concentration, annealing temperature and primer concentration are known to critically impact primer-template duplex formation, we focused on those three parameters.

Magnesium concentration and annealing temperature. We first carried out standard two-step PCR reactions using ZNA, DNA and LNA primers specific for E7. As shown in the upper panels in Figure 2A–C, ZNA primers gave rise to a single amplification product in target samples with a quantification cycle value (C_q) (15) of 16.9, achieved one and two cycles earlier than LNA and DNA, respectively. However, ZNA primers also drove non-specific amplifications and primer-dimer artefacts in both control samples (genomic DNA and no template control), which were not observed with DNA and LNA primers. Since ZNA oligonucleotides display intrinsically reduced electrostatic repulsions, we hypothesized that the off-target amplifications observed in control samples might result from inappropriate salt content of the commercial qPCR mix. Indeed, cations and especially magnesium play a central role in PCR. They increase the stability of the primer-template hybrids by reducing electrostatic repulsions between strands, but excess reduces specificity by tolerating elongation of mismatched primers or promoting primer-dimers artefacts. The catalytic activity of the polymerase is sensitive to these environmental factors as well. Postulating an excess of cations in qPCR mixes optimized for standard oligonucleotides, we then added 1 mM EDTA to the 3 mM magnesium-containing reaction mix in order to decrease Mg^{2+} (lower panels in Figure 2A–C). PCR reactions driven by LNA primers were impeded (C_q shift of +2 cycles) and reactions primed by standard DNA primers were dramatically inhibited (only one out of four target replicates detected, C_q shift of 13 cycles). In contrast,

EDTA addition did not affect ZNA oligonucleotides for target amplifications. Moreover, EDTA also prevented background signal in control samples, clearly showing that ZNAs require lower magnesium content.

In order to confirm this result, we diluted the qPCR mix twice in order to decrease the salt content. $MgCl_2$ requirement was then investigated by performing reactions at final concentrations of 1.5, 3 and 4 mM. C_q values of on- and off-target amplifications driven by ZNA, DNA or LNA primers at annealing temperatures of 57°C, 60°C and 63°C are given in Table 2. Target amplifications performed with ZNA were efficient at 1.5 mM $MgCl_2$ and C_q values remained unchanged over the studied $MgCl_2$ concentrations and annealing temperatures. Higher $MgCl_2$ decreased specificity as shown by earlier C_q values displayed in control DNA samples. DNA and LNA primers performed poorly at 1.5 mM $MgCl_2$. For those oligonucleotides, the original 3 mM magnesium concentration was the best condition to improve on-target amplification, while maintaining low non-specific signals. At 57°C, target amplifications yielded later C_q (4 and 3.5 additional cycles for DNA and LNA primers, respectively) than those primed with ZNA. Further increase of $MgCl_2$ concentration to 4 mM had little effect. The higher C_q value observed with DNA and LNA primers does not result from too high annealing temperatures because C_q values remained unchanged at 60°C for DNA and even decreased from 57°C to 63°C for LNA primers. This latter observation might rather be due to the destabilization of secondary structures or non-specific binding due to LNA moieties that compete with proper binding of LNA primers. Similar C_q values were finally achieved by increasing the DNA and LNA primer concentrations (data not shown), suggesting that ZNA oligonucleotides exhibit an intrinsically higher affinity for their target.

We assessed each primer pair's specificity at its optimal magnesium concentration (1.5 mM for ZNA, 3 mM for LNA and DNA) by calculating the C_q difference between control genomic DNA (non-specific amplification) and target genomic DNA (specific amplification) (Table 3). ZNA and LNA exhibited comparable specificities at all annealing temperatures. Due to higher T_m , both modified primers were less specific than DNA primers at 57°C ($\Delta C_q \sim 10$ versus 14.1). However, primer specificity was restored while maintaining target amplification efficiency by increasing the annealing temperature. This is further demonstrated in Figure 3 by showing amplification reactions of serial dilutions of target genomic DNA spiked in control DNA. In this experiment, the annealing temperature was 67°C, that is, 7°C above the expected T_m of standard DNA primers at 1.5 mM $MgCl_2$. ZNA primers drove highly efficient ($E = 1.01$, $R^2 = 0.999$) and sensitive PCR, as three out of four replicates containing only 3–6 copies of viral target were detected quantitatively. Non-specific amplification products in control DNA samples occurring 10 cycles after the last dilution do not affect specificity or sensitivity of detection. It is noteworthy that while spike-in experiments were intentionally performed for evaluating ZNA specificity, we observed that highly diluted target samples are only detectable under these conditions, where control DNA

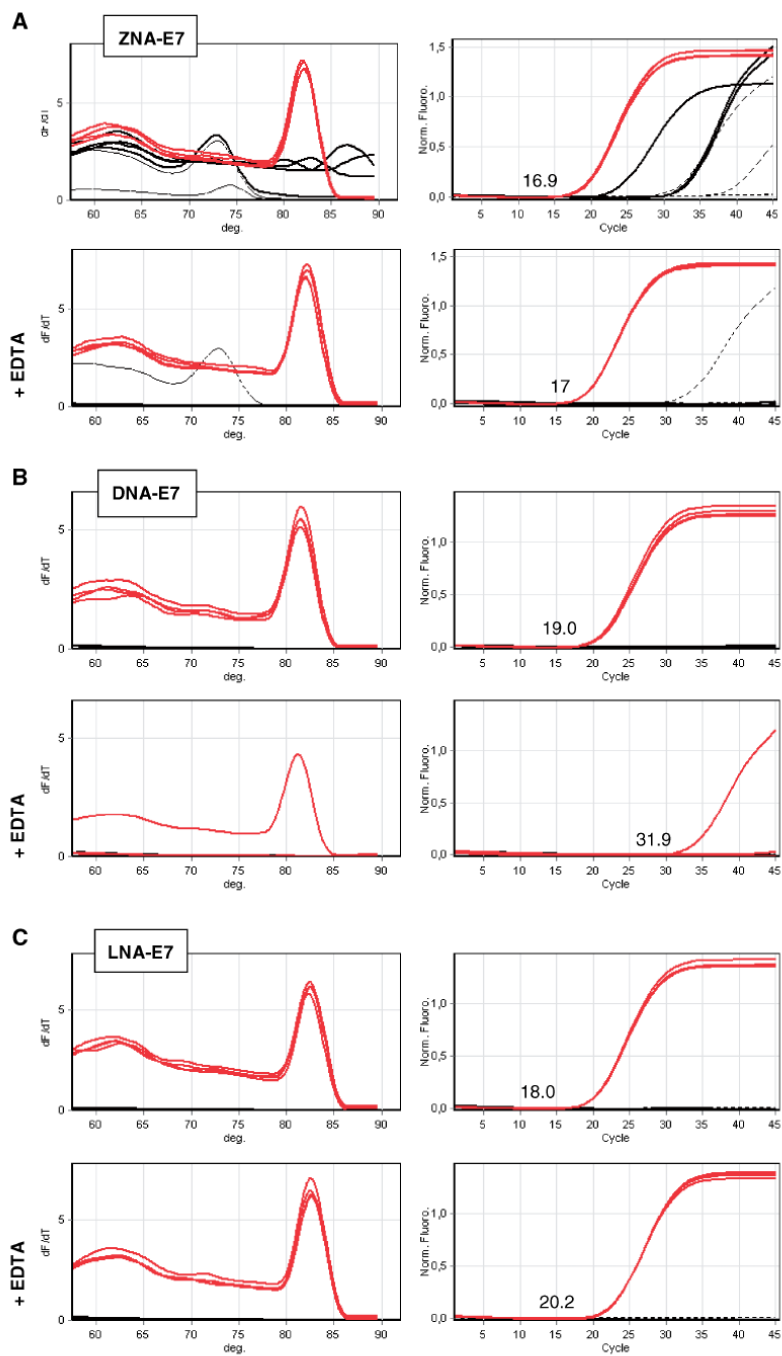


Figure 2. SYBR Green-based qPCR of HPV16-E7 using ZNA, DNA and LNA primers. Target genomic DNA (10 ng, red lines), control DNA (10 ng, black thin lines) and no template control (black dotted lines) were amplified in quadruplicate with 100 nM of ZNA-E7 (A), DNA-E7 (B), LNA-E7 (C) primer pairs. All reactions were performed using Sensimix NoRef DNA kit (Quantace) without (upper panels in A–C) and with 1 mM EDTA (lower panels in A–C) as indicated. Melting curves (left panels) and amplification plots (right panels) are represented. C_q values for target amplification are indicated. Cycling profile was 95°C (10 s), 60°C (1 min).

Table 2. C_q values obtained with ZNA, DNA and LNA primers under various $MgCl_2$ concentrations and annealing temperatures

Primer type	$MgCl_2$ (mM)	C_q target DNA			C_q control DNA		
		57°C	60°C	63°C	57°C	60°C	63°C
ZNA	1.5	16.5 ± 0.10	16.4 ± 0.03	16.2 ± 0.06	27.4 ± 0.57	28.1 ± 0.04	34.4 ± 0.48
	3	16.7 ± 0.21	16.9 ± 0.08	n.d	19.6 ± 0.03	22.3 ± 0.07	n.d
	4	16.5 ± 0.05	n.d	n.d	17.6 ± 2.10	n.d	n.d
DNA	1.5	27.5 ± 0.10	30.7 ± 0.52	33.2 ± 0.32	>45	>45	>45
	3	20.4 ± 0.03	20.2 ± 0.11	21.8 ± 0.11	34.5 ± 1.09	35.4 ± 1.7	38.5 ± 1.23
	4	19.6 ± 0.00	n.d	n.d	31.0 ± 0.18	n.d	n.d
LNA	1.5	24.6 ± 0.38	24.1 ± 0.04	24.0 ± 0.23	38.0 ± 1.41	>45	>45
	3	20.0 ± 0.13	19.4 ± 0.12	19.1 ± 0.06	29.6 ± 0.6	32.6 ± 2.79	35.2 ± 1.51
	4	19.4 ± 0.06	n.d	n.d	28.5 ± 0.04	n.d	n.d

Target genomic DNA (10 ng) or control DNA (10 ng) were amplified in duplicate with 100 nM of each E7 primer type as specified. All reactions were performed in duplicate (replicate standard deviation provided by the Rotor-Gene 6000 analysis software is indicated) using Sensimix NoRef kit 0.5×. $MgCl_2$ was adjusted to the indicated concentration. Cycling conditions were 94°C for 20 s, annealing for 20 s, 72°C for 15 s. n.d., not determined.

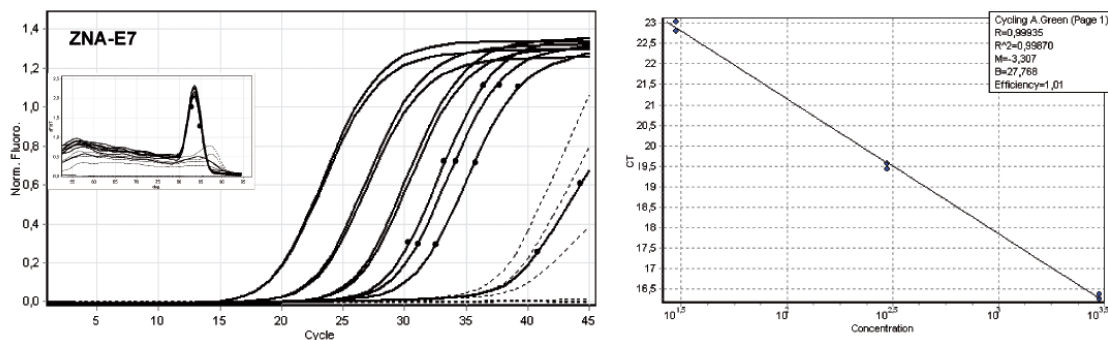


Figure 3. Amplification of HPV16-E7 using ZNA primers at high annealing temperature and low salt. Serial dilutions of target genomic DNA (10 ng to 10 pg) spiked in control DNA were amplified with 100 nM of each ZNA-E7 primers. All reactions were performed in duplicate (black thin) except 10 pg (3–6 copies of HPV16 genome), which was performed in quadruplicate (black circles). Control DNA (10 ng) and no template control are represented in dotted lines. Melting curves are shown in left top corner. The 10 pg sample was not taken into account for PCR efficiency calculation (standard curve, right panel). All reactions were performed using Sensimix NoRef DNA kit 0.5×. Cycling conditions were 94°C (20 s), 67°C (20 s), 72°C (15 s).

Table 3. Primer specificity

Primer type	$MgCl_2$ (mM)	C_q (control)– C_q (target)		
		57°C	60°C	63°C
ZNA	1.5	10.9	11.7	18.2
DNA	3	14.1	15.2	16.7
LNA	3	9.6	13.2	16.1

The difference between off- and on-target amplification was calculated from data in Table 1 for each E7 primer pair type at their respective optimal $MgCl_2$ concentration as indicated.

behaves as a carrier. Thus, the ability of ZNA to detect low amounts of target depends on the total amount of nucleic acid present in the sample and may require addition of a nucleic acid carrier, most probably to avoid adsorption artefacts.

Taken together, our data show that when comparing the three primer types under their optimal PCR conditions, ZNA primers exhibit the highest sensitivity. Even though reaction conditions may need to be adapted, high sensitivity is achieved without compromising specificity.

Primer concentration. To evaluate the respective affinity of DNA, LNA and ZNA oligonucleotides for the target, we carried out PCR reactions using low amounts of primers. Magnesium was optimally adjusted for each primer type and amplifications were performed at the annealing temperature of 60°C which is compatible with all the primers. As shown in Figure 4A, the PCR performance was dramatically affected when DNA and LNA primers were used at low concentration. A gradual decrease in yield was observed with decreasing primer concentration and both primer types were almost unproductive at 10 nM. In contrast, decreasing ZNA concentration as low as 10 nM did not impact the C_q value. Moreover, for ZNA, the PCR reaction remained highly efficient as shown by the standard curve in Figure 4B. Sensitivity was not altered as samples containing 3–6 copies of target were quantitatively detected. Finally, decreasing ZNA primer concentration restored full specificity as amplifications only occurred in target samples (Figure 4B). Adding increasing amounts of free spermine to the reaction did not allow standard DNA primers to drive amplification when used at the

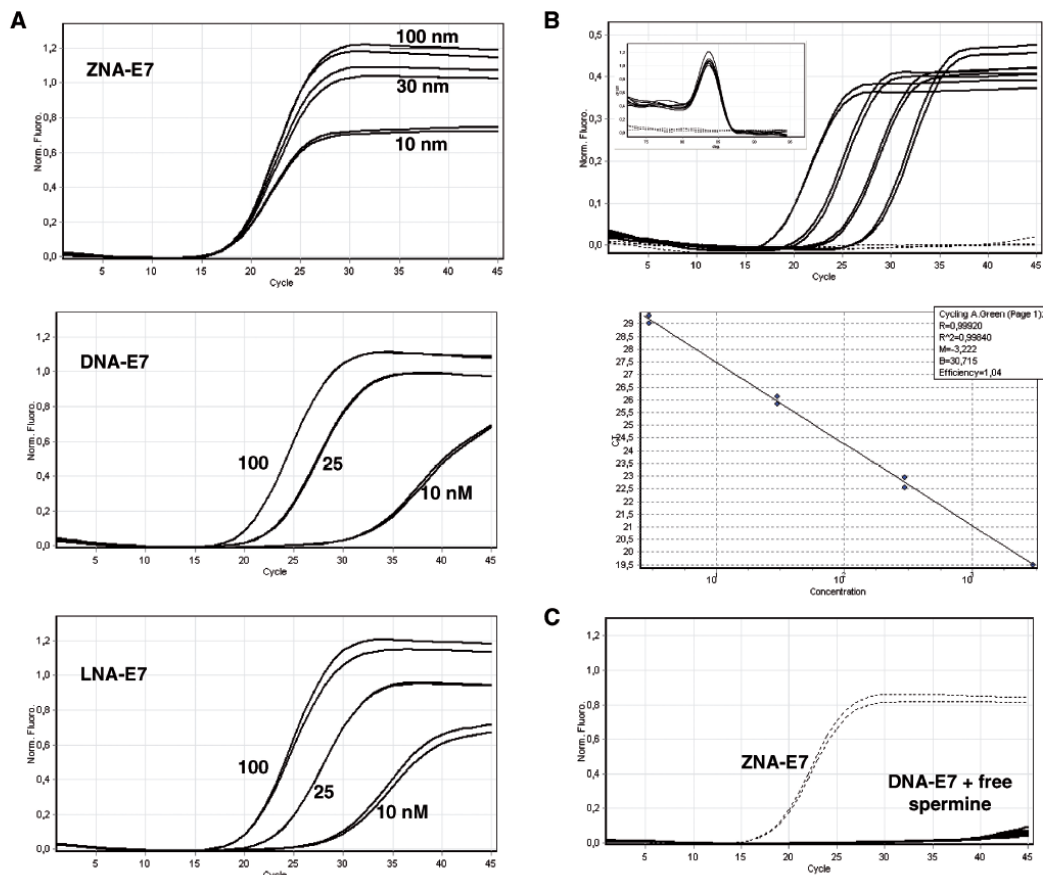


Figure 4. Effect of primer concentration on PCR. (A) Variable amounts of E7-specific primers were used to amplify 10 ng of target genomic DNA. Primers were ZNA-E7 (upper panel), DNA (middle panel) or LNA primers (lower panel). (B) Serial dilutions of target genomic DNA (10 ng to 10 pg) spiked in control DNA were amplified with 10 nM each of ZNA-E7 primers. Control DNA (10 ng) and no template control are shown (dotted lines). Melting curves (left top corner in upper panel in B) and standard curve (lower panel in B) are shown. (C) DNA-E7 primers were used at 10 nM with increasing amounts of free spermine (0, 10, 40 and 80 nM). Amplifications using 10 nM ZNA-E7 are shown (dotted lines). All reactions were carried out in duplicates using Sensimix NoRef DNA kit (Quantace) 0.5 \times . MgCl₂ was generally 1.5 mM except 3 mM for LNA and DNA primers in (A). Cycling conditions were 95 $^{\circ}$ C (10 s), 60 $^{\circ}$ C (1 min).

concentration of 10 nM (Figure 4C). This observation demonstrates that a covalent linkage of spermines to the oligonucleotide is required to confer ZNA oligonucleotides an exceptionally high affinity towards their complementary sequence. Interestingly, the level of the PCR plateau is decreasing with ZNA primers concentration, indicating a reduction in the final amount of product at the reaction end-point (Figure 4A, upper panel). The ability of ZNAs to stop production of amplicon molecules early in the reaction without affecting other PCR reaction features is of interest for multiplex PCR applications where simultaneous target amplifications in a single reaction compete for finite amounts of reagents.

AT-rich sequences and standardization. In order to evaluate ZNAs performance in various GC contexts, we assessed viral genome detection using AT-rich L1 primer pairs containing 20–30% GC (Table 1) and compared

PCR performances with those obtained with E7 primers exhibiting 46–48% GC. As expected, primer base sequence had a large impact on PCR performances and optimal reaction conditions for standard DNA oligonucleotides. At appropriate annealing temperature (50 $^{\circ}$ C), a 5-fold larger amount of DNA-L1 primers or a combination of more primers and higher MgCl₂ concentrations is required to achieve the PCR performance obtained with DNA-E7 primers (data not shown). In contrast, ZNA-L1 primers containing four spermines operated optimally (Figure 5A; $E = 1.01$, $R^2 = 0.989$) at the same primer and magnesium concentrations used for ZNA-E7 oligonucleotides (100 nM primers, 1.5 mM MgCl₂). The reaction sensitivity remained unaffected as all replicate samples containing 5–10 target copies and half replicate samples containing 1–2 target copies were detected. Strikingly, both types of ZNA primers led to similar C_q 's [19.7 for 2 ng (L1 primers, Figure 5A) versus

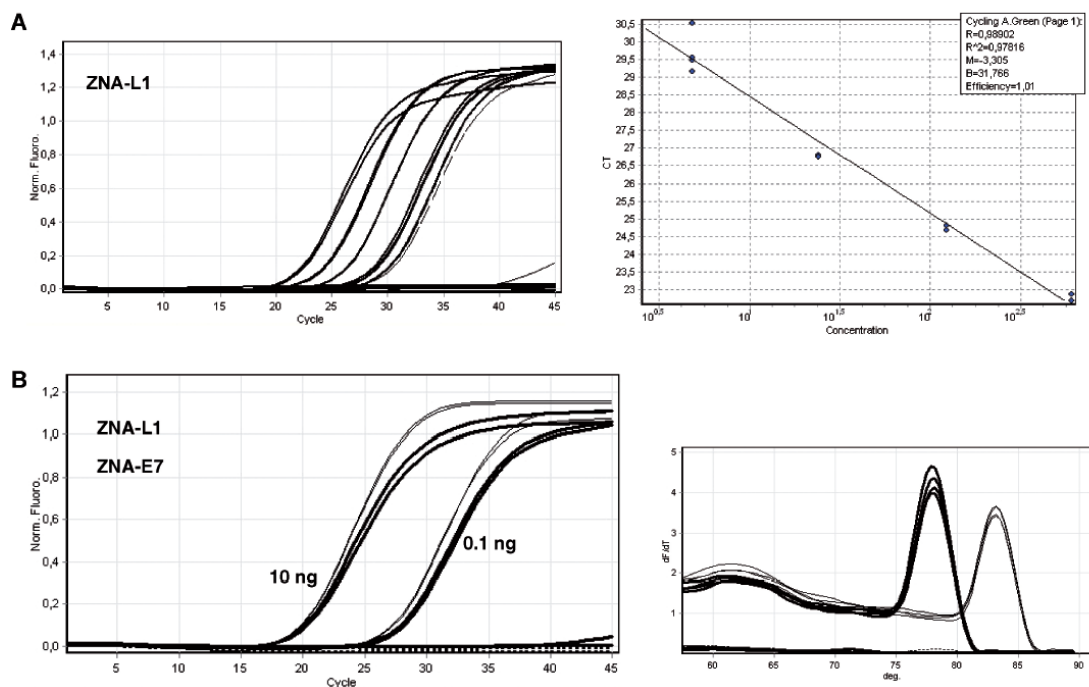


Figure 5. DNA amplification with AT-rich ZNA primers. (A) Serial dilutions (2 ng to 3.2 pg) of target genomic DNA spiked in control DNA were amplified with ZNA-L1 primers containing four spermine units (100 nM each). Samples containing 2, 0.4 and 0.08 ng were amplified in duplicates and those with 16 and 3.2 pg corresponding to 5–10 copies and 1–2 copies, respectively were amplified in quadruplicate. The 3.2 pg sample (dashed lines) was not taken into account for PCR efficiency calculation (A, right panel). No amplification was detected in the controls. All reactions were performed using Sensimix NoRef DNA kit 0.5× concentrated. Cycling conditions were 94°C (20 s), 55°C (20 s), 72°C (15 s). (B) Target genomic DNA (10 or 0.1 ng spiked in control DNA) or control DNA (10 ng) was amplified with 100 nM ZNA-L1 primers containing five spermines (thin lines), DNA-L1 or LNA-L1 primers (dotted lines) using the QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen). Solid curves show amplifications using 100 nM ZNA-E7 primers. Cycling conditions were 95°C (10 s) and 60°C (30 s). Melting curves are represented (B, right panel).

19.5 for 1 ng (E7 primers, Figure 3)]. Thus, while DNA primer pairs with different base sequences exhibit different intrinsic affinities for their targets requiring different reaction conditions, their ZNA counterparts yield constant performances under standardized conditions; the only variable being the annealing temperature. ZNA-L1 primers indeed performed best at an annealing temperature of 55°C [i.e. 2°C above the estimated T_m of standard DNA-L1 primers (Figure 5A)], and increasing it to 60°C induced a C_q shift of three cycles to the right (data not shown). However, using such AT-rich primers at a standard annealing temperature of 60°C could be of interest for hydrolysis probe-based detection, multiplex PCR or high-throughput experiments. We, therefore, grafted an additional spermine residue to the ZNA primers, which led to optimal amplification efficiency and sensitivity at 60°C (data not shown). We confirmed this result using a PCR reagent dedicated to fast PCR (Quantifast Sybr Green kit, Qiagen). According to the manufacturer, no magnesium adjustment was required; thus, all reactions were carried out under exactly the same conditions. As shown in Figure 5B, neither DNA-L1 nor primers containing two LNA moieties were capable of amplifying the L1 target at 60°C, while ZNA

primers containing five spermines performed efficiently with C_q 's similar to ZNA-E7 oligonucleotides.

Taken together, our results show that ZNAs drive efficient, sensitive and specific PCR at high annealing temperature and low magnesium concentration. In particular, ZNAs improve primers performing poorly such as AT-rich sequences, allowing their use under standardized conditions and circumventing magnesium and primer concentration adjustments. The ZNA T_m can be tuned by varying the number of spermines, thus giving the possibility of easily designing efficient primers operating at any given annealing temperature.

Fast cycling, high sensitivity

In order to explore the impact of spermine conjugation on hybridization kinetics, we compared ZNA, LNA and DNA priming activities following a universal, a fast and a very fast cycling protocol with combined annealing/elongation steps of 60, 30 and 15 s, respectively. Target DNA (10 ng) was amplified in quadruplicates using each type of E7 primer pair. Mean C_q values and standard deviations are represented in Figure 6. ZNA primers yielded a constant C_q value irrespective of PCR conditions,

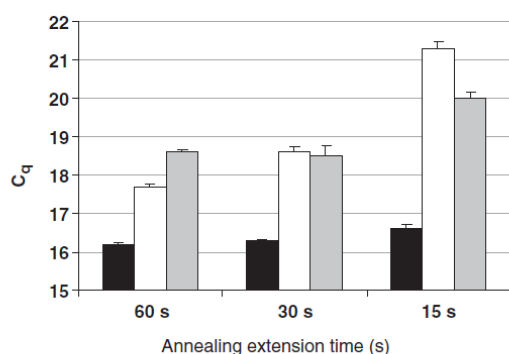


Figure 6. Fast cycling PCR. Mean C_q values and standard deviations (error bars) from quadruplicate reactions carried out with ZNA-E7 (black bars), DNA-E7 (white bars) or LNA-E7 (grey bars) primers as a function of annealing/extension time. Reactions were carried out on 10 ng of target genomic DNA with 100 nM each primer using Sensimix NoRef DNA kit (Quantace) 0.5 \times concentrated. $MgCl_2$ was 1.5 mM (ZNA primers) and 3 mM (LNA and DNA primers). Cycling conditions were 95°C (10 s), 60°C as indicated.

which is overall the lowest C_q measured for the three primer species at any cycling condition. Repeatability was not affected by fast cycling protocols as demonstrated by SDs < 0.1 and confidential intervals ranging below 0.30 cycles (data not shown). However, fast cycling had a dramatic impact on DNA primers efficiency and to a lower extent on LNA primers as shown by the increase in C_q 's. The same results were obtained using a mix dedicated to fast cycling (data not shown), which suggested that ZNA oligonucleotides exhibit faster binding kinetics.

In keeping with the above results, we observed that ZNA-primed amplifications were detected 2–3 cycles earlier than LNA- and DNA-primed reactions (Figure 6), whatever the length of the annealing extension step. In order to better understand the underlying mechanism of the improved sensitivity of ZNAs, we performed serial dilutions amplifications of target genomic DNA using each primer pairs and compared PCR efficiencies (Table 4). Interestingly, earlier C_q 's provided by ZNA primers were not associated with a higher PCR efficiency ($E = 0.94$ for ZNA and 0.96 for DNA primers). This indicates that the binding of ZNA, DNA or LNA primers to the template are comparable in the central-cycle window of the reaction where PCR efficiency is measured, amplicon concentration being sufficient to emit detectable fluorescence. Our data, therefore, suggest that ZNA oligonucleotides are capable of binding their target with a greater efficiency during the early stages of PCR, when the template is present in low amounts. This result gives further support to the exceptionally high affinity of ZNA primers for their target.

Reverse transcription using ZNAs

The fast and efficient binding of ZNA primers to low amounts of template during the initial PCR cycles prompted us to investigate whether a ZNA primer could improve Reverse transcription (RT), the initial and the most crucial step in RT-qPCR. In particular, we addressed

Table 4. PCR efficiencies (E) calculated from the slope of standard curves using ZNA-E7, DNA-E7 and LNA-E7 primers

Primers	C_q^a	E	R^2^b
ZNA-E7	17.7 \pm 0.01	0.94	0.999
DNA-E7	20.7 \pm 0.09	0.96	0.993
LNA-E7	19.3 \pm 0.00	0.89	0.999

Target genomic DNA (10 ng) and 10-fold serial dilutions (up to 0.01 ng) spiked in 10 ng of control DNA were amplified in duplicate with 100 nM each primer using QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen). Cycling conditions were 95°C (10 s), 60°C (30 s).

^a C_q obtained from amplification of 10 ng target DNA.

^bFrom the linear regression.

the RNA to cDNA conversion of low-expressed messengers as they are prone to higher variability as well as reliability issues (18). For these experiments, we quantified the HMGA2 oncogene, a member of the high mobility group AT-hook family of non-histone chromatin proteins which is a low-expressed gene in HeLa cervix carcinoma cells and is over-expressed in A549 lung carcinoma cells (19). Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 gene (HPRT1) was chosen as calibration reference. The reverse PCR primers HMGA2R and HPRT1R were used as gene-specific primers for the RT step (Table 1). The ZNA-HMGA2R primer was synthesized with four spermines at the 5'-end, and used for priming a pool of total RNA from A549 or HeLa cells using Superscript III (Invitrogen). The same RNA pool was reverse transcribed using a standard DNA-HMGA2R primer under identical conditions. The standard DNA-HPRT1 primer was simultaneously added to all samples to allow HPRT1 expression measurement as an internal control. After the RT step, reactions were subsequently subjected to qPCR with SYBR Green I detection using the standard DNA primer pair. As shown in Figure 7A, the HMGA2 mRNA from A549 cells was detected three cycles earlier when the RT reaction was primed with the ZNA primer ($C_q = 19.08$ and 19.42, respectively, for 100 and 10 nM) instead of the DNA primer ($C_q = 22.59$). HPRT1 calibrations ($C_q = 16.3$, 15.8 and 15.8) confirmed identical amounts of total RNA in the samples. The PCR efficiency for both HPRT1 and HMGA2 targets were 100% as assessed by amplifying serial dilutions of poly(dT)-primed cDNA from A549 cells (data not shown). Thus, a three-cycle difference in C_q corresponds to a 8-fold difference in starting cDNA material, indicating that the ZNA primer is most likely to drive the RNA to cDNA conversion with a 8-fold higher efficiency than its standard counterpart. However, an alternative explanation was that DNA and ZNA primers both generate cDNA with the same efficiency, but that the material is amplified with a greater sensitivity in the subsequent PCR reaction due to residual ZNA-HMGA2R primer from the RT reaction (respectively, 10 and 1 nM in Figure 7). Addition of 1 nM ZNA-HMGA2R to the PCR reaction had no impact on amplification of cDNA primed with the standard DNA primer (data not shown), ruling out the latter hypothesis. Primer-dimers occurred in RT negative controls lacking the reverse transcriptase or lacking RNA

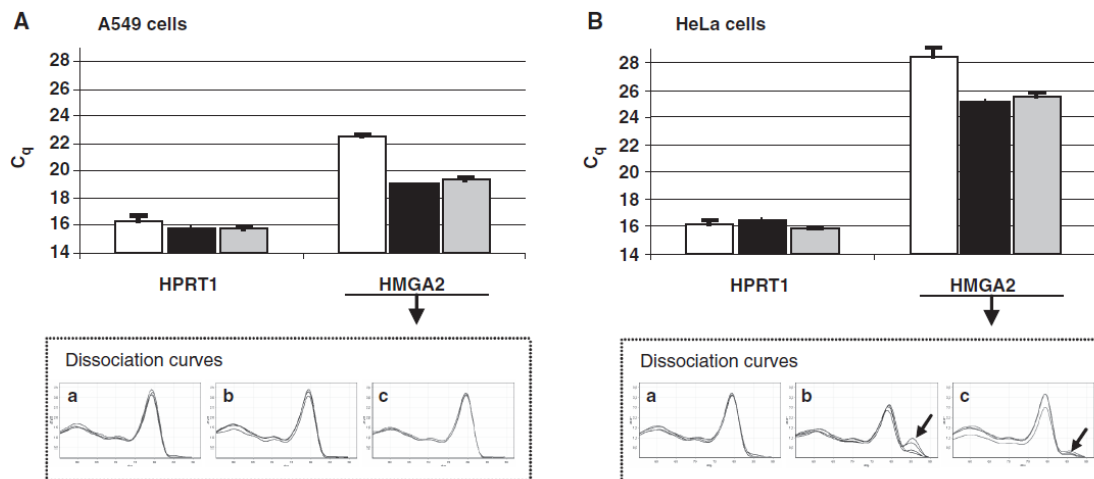


Figure 7. ZNA primers improve RNA to cDNA conversion. Mean C_q values for HPRT1 and HMGA2 were determined by RT-qPCR on 200 ng of total RNA extracted from A549 (A) and HeLa (B) cells. Dissociation curves of HMGA2 amplification product are represented in lower panels (a–c). RT reactions were performed in duplicate with 100 nM HPRT1R and 100 nM DNA-HMGA2R (white bars, plot a), 100 nM ZNA-HMGA2R (black bars, plots b) or 10 nM ZNA-HMGA2R (grey bars, plot c). Each cDNA corresponding to 10 ng of total RNA was subjected to SYBR Green-based qPCR in duplicate. Error bars indicate standard deviation.

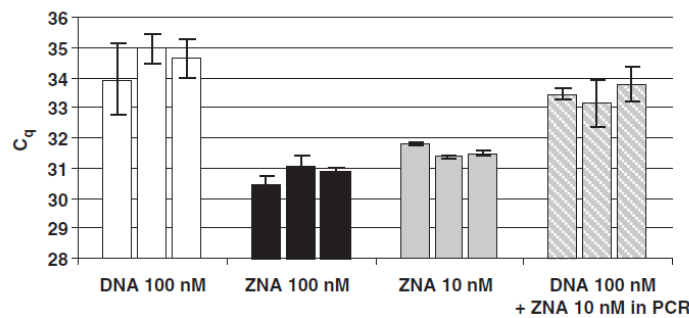


Figure 8. ZNA primers improve the accuracy of low-abundant gene expression measurement. Quantification of HMGA2 target in three independent RT-qPCR reactions. Bars represent the C_q value for each RT reaction and error bars indicate qPCR duplicate standard deviations. cDNA was obtained by RT of 200 ng of total RNA extracted from HeLa cells using 100 nM HPRT1R and 100 nM DNA-HMGA2R (white bars, dashed bars), 100 nM ZNA-HMGA2R (black bars) or 10 nM ZNA-HMGA2R (grey bars). Each cDNA corresponding to 10 ng of total RNA was subjected to qPCR using a specific hydrolysis probe for detection. White and dashed bars represent qPCR reactions on the same cDNA samples but 10 nM of ZNA-HMGA2R primer was added in qPCR reaction represented in dashed bars.

when ‘primed’ with ZNA-HMGA2R. However, their C_q values were >32 which corresponds to less than one molecule under our conditions and the use of the specific hydrolysis probe avoided their detection (data not shown). In HeLa cells, HMGA2 is ~ 60 -fold less abundant than in A549 cells as shown by the six-cycle C_q increase (Figure 7B). We confirmed that the ZNA RT primer is providing more cDNA than the standard DNA primer ($C_q = 25.1$ and 28.4 , respectively, for 100 nM). However, careful analysis of melting curves also showed that off-target products were generated in addition to the specific amplicon. Although absent in A549 cDNA (Figure 7A, plots b and c), ZNA-induced mispriming occurred when RT was performed with RNA extracted from HeLa cells, i.e. when the target was present at very low concentration

(Figure 7B, plot b). Mispriming, however, decreased upon reduction of the ZNA primer concentration to 10 nM (Figure 7B, plot c). We then performed the same experiment using the specific hydrolysis probe to detect exclusively the specific amplicon (Figure 8). RT reactions were carried out in triplicate and each cDNA was quantified by qPCR in duplicates. We confirmed that the ZNA primer allows earlier detection of the HMGA2 mRNA, thus, demonstrating that the presence of non-specific amplification material did not interfere with quantification of the HMGA2 target using SYBR Green for detection in the previous experiment. More importantly, lower C_q values were also associated with less variability as shown by the much lower standard deviations between qPCR duplicates. Thus, when used

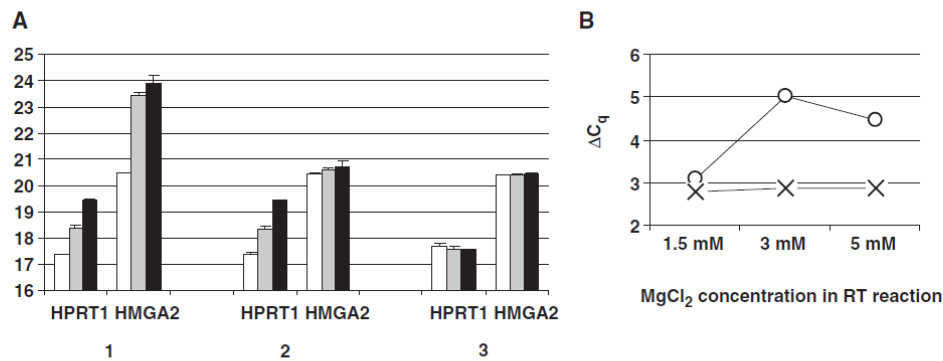


Figure 9. Magnesium induces RT efficiency variability. (A) Mean C_q values for HPRT1 and HMGA2 determined by RT-qPCR using 100 nM of each gene-specific primer DNA-HPRT1R/DNA-HMGA2R (1), DNA-HPRT1R/ZNA-HMGA2R (2) or ZNA-HPRT1R/ZNA-HMGA2R (3) for cDNA synthesis. RT reactions were performed using 200 ng of total RNA extracted from A549 cells with MgCl₂ 1.5 mM (white bars), 3 mM (grey bars) or 5 mM (black bars). Each cDNA corresponding to 2 ng of total RNA was subjected to SYBR Green-based qPCR in duplicate. Error bars indicate the standard deviation. (B) $\Delta C_q = C_q(\text{HPRT1}) - C_q(\text{HMGA2})$ as a function of MgCl₂ concentration in the RT reaction. ΔC_q were calculated from DNA priming conditions [circles, from data (1) in A] and ZNA priming conditions [cross, from data (3) in A].

as primers in RT, ZNAs allow a more accurate quantification of weakly expressed genes by generating larger amounts of cDNA molecules. Finally, ZNA-HMGA2R primer used at 100 nM provided lower C_q values than at 10 nM (mean $C_q = 30.8$ and 31.6 , respectively). Given that the same difference in C_q 's was observed when DNA-primed cDNA was amplified in the presence or absence of additional 10 nM ZNA primer (mean $C_q = 34.5$ and 33.5 , respectively), we conclude that ZNAs improve RT-qPCR at both steps: RNA to cDNA conversion and subsequent qPCR.

We finally addressed the role of magnesium in RT. Instead of using the 5 \times First-Strand Buffer supplied with the reverse transcriptase and containing 3 mM final MgCl₂ concentration as in previous experiments, we used the magnesium-free 10 \times RT buffer (Invitrogen). RT reactions were carried out with 1.5, 3 or 5 mM MgCl₂ and 100 nM of HPRT1- and HMGA2-specific primers. Three RT priming conditions were compared: both primers being standard DNA sequences, or their ZNA counterparts or the combination DNA-HPRT1 and ZNA-HMGA2 (Figure 9A, conditions 1, 3 and 2, respectively). Interestingly, standard DNA primers operated optimally at 1.5 mM MgCl₂, with RT efficiency similar to ZNA primers. However, RT reactions primed with DNA primers were inhibited by increasing magnesium concentrations as shown by the increase in C_q values. Moreover, magnesium variations did not affect HMGA2 and HPRT1 quantification to the same extent. Measuring HMGA2 gene expression relative to HPRT1 was, thus, subjected to large variations up to 66% depending on experimental conditions (Figure 9B). In contrast, when ZNA primers were used for cDNA synthesis, C_q 's remained constant and provided a robust and precise quantification of the target gene.

DISCUSSION

In the present study, we have addressed the specificity of ZNA oligonucleotides by using them as primers for PCR

detection of a genomic target. We have shown that ZNAs exhibit a very high affinity for their target that requires adapting experimental conditions, but by doing so, the ZNA displays strict recognition selectivity. Similarly to standard oligonucleotides, ZNA specificity indeed relies on optimized conditions including salt concentration, annealing temperature or target and primer concentrations that may be different from those optimized for standard molecules.

First, we have shown that ZNAs require low magnesium concentrations. At higher MgCl₂ concentrations needed for unmodified primers, ZNAs may generate off-target amplifications and primer-dimer artefacts. Beside its catalytic role for polymerase activity, magnesium increases the stability of primer-template hybrids by reducing electrostatic repulsions between strands. When present in excess, divalent cations decrease specificity by stabilizing mismatched duplexes that can be extended. For ZNA, the oligospermine tail covalently attached to the oligonucleotide plays to some extent the role of magnesium for shielding negative charges repulsion between strands. In this context, magnesium is no longer required to facilitate specific base pairing. Yet, qPCR reactions are generally performed with ready-to-use mixes including all needed components except primers and target. There is a plethora of kits available in the market exhibiting various performances and shifting from one or another often requires adjustment of experimental conditions. Usually the complete reagent composition is not disclosed but magnesium concentration, when provided, is within 3–6 mM. Thus, to counteract the presence of excess magnesium, we have chosen to add EDTA, a known inhibitor of PCR shown to affect differentially PCR reactions, partly depending on amplicon GC content and primer T_m 's (20). We have tested seven different PCR mixes from various manufacturers, and all performed well with ZNAs when complemented with EDTA (data not shown). We also observed that once the optimal EDTA concentration

was determined for the ZNA pair with ~50% GC, no further optimization was required even for the ZNA pair with 20–30% GC content. Conversely, no magnesium adjustment was required for those ZNA primer pairs with different GC contents. Thus, ZNA may circumvent fastidious salt optimizations generally required for each conventional primer pairs to achieve efficient and specific PCR reactions, thereby presenting an advantage for setting-up PCR reactions. It may be of interest in future work to investigate whether ZNAs are more resistant to PCR inhibitors depleting free Mg^{2+} that may be potentially co-purified during nucleic acid extraction (21,22).

We have also demonstrated that ZNA primers allow PCR to be run at higher annealing temperature than using unmodified primers. Interestingly, the highest annealing temperature which did not affect PCR efficiency was in agreement with T_m predictions. Given that electrostatic forces are non-directive, the T_m increase per spermine is independent of the base sequence (13). The ZNA T_m was found to be easily predictable, using a simple mathematical relation depending on the intrinsic DNA oligonucleotide T_m , on the length N of the oligonucleotide and on the number z of spermines: $T_m(\text{ZNA}) = T_m(\text{DNA}) + 36z/(N - 3.2)$. This straightforward linear dependence contrasts with LNAs, where T_m increments (and sometimes decrements) are highly sequence and context dependent (23). However, the constants of the above mathematical relation depend on the buffer. The T_m increment per spermine is dependent on the ionic strength (the lower the salt concentration, the higher the impact of spermine) and on the pH, with less stable binding of ZNAs to their target sequences at alkaline pH where spermines are less protonated. We estimate that PCR conditions at annealing steps using a classical reagent containing 10 mM Tris buffer, 50 mM NaCl and 3 mM $MgCl_2$ are not significantly different from the HEPES 10 mM, pH7.4, NaCl 150 mM buffer used by Behr and collaborators (13), given that the pH value of Tris decreases with increasing temperatures and is close to neutrality between 60°C and 72°C (24). According to this postulate, the T_m increase per spermine for a 22-mer oligonucleotide is predicted to be $36/(22 - 3.2) = 1.9^\circ\text{C}$ per spermine. In the present study, ZNA containing four and five spermines were, thus, expected to exhibit a stabilization of 7.6°C and 9.5°C over DNA oligonucleotides. Interestingly, PCR were successfully conducted using ZNAs at annealing temperatures approximately 6°C and 8°C above the maximum annealing temperatures implemented for unmodified sequences, suggesting a direct correlation between calculated T_m and annealing temperatures. More data will be generated to develop a prediction tool capable of accurately calculating the T_m in various buffers. Still ZNAs already provide means of finely and accurately manipulating the T_m of a given oligonucleotide sequence. The possibility of easily standardizing the T_m is of prime interest for numerous PCR applications, such as multiplex PCR or high-throughput experiments. For example, we showed the potential of ZNAs for improving poorly performing AT-rich DNA primers. Their ZNA

counterparts enabled us to conduct PCR under standardized conditions of magnesium and primer concentrations at an annealing temperature of 60°C, yielding the same high performance as a ZNA primer pair with a standard 50% GC content under the same conditions. ZNAs will, thus, help to design efficient assays within AT-rich regions to be run under universal conditions. In particular, this will provide the ability to implement 5'-nuclease assays in such sequences where standard primers exhibit low T_m .

In addition, we found that ZNAs are able to optimally detect a genomic target at very low concentration (10-fold less than DNA- or LNA-substituted primers in the present study). Interestingly, reducing ZNA primers concentration did not affect any PCR reaction feature (C_q values, dynamic range, sensitivity and efficiency), but decreased the level of the plateau. Several factors have been proposed to explain the amplification arrest in the late phase of PCR, including competitive binding of DNA polymerase to its amplification product or depletion of dNTPs (25). Our data support the existence of a competition between primer-template and amplicon-amplicon reannealing (26). Furthermore, the possibility to stop the reaction early while maintaining PCR performances, which is only observed with ZNAs, is of interest for multiplex PCR applications. When one of the targets is much more abundant than the others at the beginning of the reaction, its early amplification may potentially inhibit amplification of the less abundant targets in the reaction by depleting reaction components. To avoid such a competition, the primers concentration for the most abundant target should be limited in order to stop the reaction soon after the signal detection. This limitation, however, often affects PCR efficiency (27). Instead, the exceptional high affinity of ZNAs allows their use at considerably lower concentration without impacting PCR efficiency. Moreover, low ZNA concentrations also ensure lower background amplifications.

Another strong advantage of ZNA primers demonstrated here is their ability to improve the sensitivity of detection in the early stage of PCR reaction when the target is present in low abundance. Later during the reaction, when the amplicon is detectable, no difference in PCR efficiency was observed compared to reactions primed with DNA or LNA primers. The greater binding of ZNA primers at the beginning of the reaction results in an improvement of the PCR sensitivity corresponding to earlier C_q values. Mechanistically, formation of the primer-template complex is a second-order reaction proportional of both primer concentration and target amount. The finding that ZNAs are prone to trigger productive amplification at low concentrations together with the ability of improving recognition of rare targets suggests that ZNAs exhibit a high primer-template association rate. It is likely that spermine conjugation increases the local concentration of ZNA in the template vicinity, resulting in a significant increase in effective concentration of primer near the target sequence. Our result supports a previous model suggesting that spermine binds DNA with a high affinity, crawls along the molecule

within the minor groove until the oligonucleotide finds its target sequence (28,29).

In order to further understand the mechanism underlying the high affinity of ZNAs, we performed qPCR amplification using fast cycling protocols. We demonstrated that ZNAs are not affected by a drastic reduction of the annealing time, compared with DNA or LNA primers, suggesting that primer-template formation occurs with faster kinetics than with DNA or LNA primers. Such an acceleration of hybridization has been observed previously for uncharged PNAs or oligonucleotides conjugated with cationic peptides (30,31). Consistent with the previous finding that LNA-increased stability results from a slower dissociation rather than faster association of the complexes (32), our data support a distinct mechanism to stabilize hybridization of ZNAs, explaining the different behaviours observed in the present study for both modified oligonucleotides. In particular, we have demonstrated here that ZNAs exhibit improved performances using rapid PCR, and particularly an earlier detection relative to DNA and LNA oligonucleotides. Having emerged in order to reduce the PCR analysis time, fast cycling protocols have nevertheless been shown to be associated with loss of sensitivity or increase in variability (33). Whether this is also the case for ZNAs remains to be explored in detail.

The greater ability to bind rare targets prompted us to investigate whether ZNA could improve RT which is used in most techniques to quantify gene expression. RT-qPCR is the most widely used method to determine expression levels, but it depends on numerous critical considerations about assay design, technical and analytical aspects to provide reliable data (34). The first molecular step in RT-qPCR is the conversion of RNA to cDNA which has been shown to be the source of most of variability (18). One of the reasons leading to a lack of reproducibility is the low efficiency of reverse transcriptase that has been estimated to be ~20%, dropping to 6% for low-abundance RNA templates (35). Interestingly, we have shown here that ZNA primers improve the yield of RNA to cDNA conversion under standard conditions. For a given sample, higher amount of cDNA templates are obtained and used as substrate for subsequent qPCR reaction leading to earlier detection. This result is of particular interest in the context of low-abundant targets, since accurate measurements are compromised by the inherent variability of PCR amplification in the presence of small amount of template (36,37). We have indeed demonstrated that the use of the ZNA RT primer significantly increases the reliability of HMGA2 mRNA measurement in HeLa total RNA. Moreover, achieving a higher yield of cDNA provides the possibility to dilute samples, thereby offering the possibility to overcome inhibition due to the presence of contaminants from biological samples.

Finally, we have performed RT reactions with various concentrations of magnesium and observed that the increase in magnesium concentration induces a decrease in priming efficiency using standard DNA primers, leading to high variations in target quantification. This suggests that a slight variation of salt content in the

RNA preparation may interfere with RT efficiency, leading to extensive variations in C_q determinations and finally to inaccurate data. This also may lead to inconsistent results between studies or laboratories. In contrast, RT reactions primed with ZNAs were not affected by magnesium variations, providing a more accurate measurement of the gene expression. Furthermore, this observation possibly explains in part the mechanism by which ZNAs improve RNA to cDNA conversion. Indeed, salt stabilizes intramolecular interactions of RNA molecules and potentially the primer accessibility to its binding site if the latter is prone to be folded. Due to its high affinity, and particularly fast binding kinetics, ZNA may be capable of binding the primer site even when the single-stranded conformation has short lifetimes. This would explain the greater priming activity of ZNAs under standard magnesium concentrations that is not observed when $MgCl_2$ was lower. In agreement with this hypothesis, the relative improvement of ZNA RT priming seems to be dependent on the nature of target and not on its amount. Indeed, HMGA2 mRNA to cDNA conversion yield was shown to be 8-fold increased in both HeLa and A549 extracts in which the level of expression of RNA messenger differs significantly, while HPRT1 RT appeared to be only 2-fold more efficient using ZNA primer compared with its standard counterpart.

In conclusion, ZNAs are easy-to-design modified oligonucleotides that exhibit a very high affinity for the target sequence without affecting the specificity of recognition. Extensive use of ZNAs will provide a detailed evaluation of the potency of these new modified oligonucleotides. However, this study demonstrates that used as primers, ZNAs offer the ability to work at higher annealing temperature, low primer concentrations, low magnesium concentrations and under fast protocols. Thus, they may be ideal for applications such as multiplex PCR or amplification in AT-rich regions. Our data also show that ZNAs are particularly promising in RT, since they improve the yield of cDNA synthesis. Their evaluation as qPCR probes is in progress. Finally, this work has given us a deeper understanding of ZNA hybridization and the improvement provided which will also benefit to other nucleic acid-based technologies.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We warmly thank Jean-Marc Strub (CNRS, France) for mass spectrometry analysis of ZNA oligonucleotides as well as Pierre Muller and Vincent Ciriméne (ChemTox, France) for their implication and support.

FUNDING

Competitivity cluster Alsace Biovalley; the Ministère de l'Industrie et the Direction Générale des Entreprises

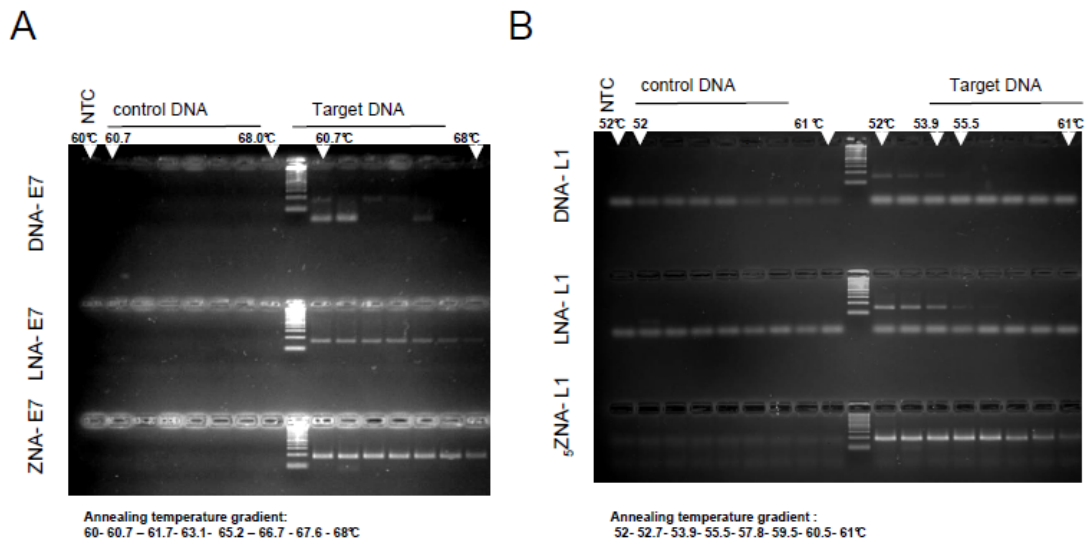
(project number 2005-2319-06A-045); the Région Alsace and the Communauté Urbaine de Strasbourg. Funding for open access charge: Polyplus-transfection SA.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Bustin,S.A., Benes,V., Nolan,T. and Pfaffl,M.W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J. Mol. Endocrinol.*, **34**, 597–601.
- Kubista,M., Andrade,J.M., Bengtsson,M., Forootan,A., Jonak,J., Lind,K., Sindelka,R., Sjoback,R., Sjogreen,B., Strombom,L. *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.*, **27**, 95–125.
- Nolan,T., Hands,R.E. and Bustin,S.A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.*, **1**, 1559–1582.
- Afonina,I., Zivarts,M., Kutuyavin,I., Lukhtanov,E., Gamper,H. and Meyer,R.B. (1997) Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2657–2660.
- Kutuyavin,I.V., Afonina,I.A., Mills,A., Gorn,V.V., Lukhtanov,E.A., Belousov,E.S., Singer,M.J., Walburger,D.K., Likhov,S.G., Gall,A.A. *et al.* (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 655–661.
- Costa,J.M., Ernault,P., Olivi,M., Gaillon,T. and Arar,K. (2004) Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR. *Clin. Biochem.*, **37**, 930–932.
- Latorra,D., Arar,K. and Hurley,J.M. (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol. Cell Probes*, **17**, 253–259.
- Levin,J.D., Fiala,D., Samala,M.F., Kahn,J.D. and Peterson,R.J. (2006) Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e142.
- Arora,A., Kaur,H., Wengel,J. and Maiti,S. (2008) Effect of locked nucleic acid (LNA) modification on hybridization kinetics of DNA duplex. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 417–418.
- Pellestor,F. and Paulasova,P. (2004) The peptide nucleic acids, efficient tools for molecular diagnosis (Review). *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 521–525.
- 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.
- Voirin,E., Behr,J.P. and Kotera,M. (2007) Versatile synthesis of oligodeoxyribonucleotide-oligospermine conjugates. *Nat. Protoc.*, **2**, 1360–1367.
- 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. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13500–13505.
- Ririe,K.M., Rasmussen,R.P. and Wittwer,C.T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **245**, 154–160.
- Bustin,S.A., Benes,V., Garson,J.A., Hellems,J., Huggett,J., Kubista,M., Mueller,R., Nolan,T., Pfaffl,M.W., Shipley,G.L. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
- de Roda Husman,A.M., Walboomers,J.M., van den Brule,A.J., Meijer,C.J. and Snijders,P.J. (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.*, **76**(Pt 4), 1057–1062.
- Hesselink,A.T., van den Brule,A.J., Groothuismink,Z.M., Molano,M., Berkhof,J., Meijer,C.J. and Snijders,P.J. (2005) Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4868–4871.
- Stahlberg,A., Hakansson,J., Xian,X., Semb,H. and Kubista,M. (2004) Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin. Chem.*, **50**, 509–515.
- Lee,Y.S. and Dutta,A. (2007) The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.*, **21**, 1025–1030.
- Huggett,J.F., Novak,T., Garson,J.A., Green,C., Morris-Jones,S.D., Miller,R.F. and Zumla,A. (2008) Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognized phenomenon. *BMC Res. Notes*, **1**, 70.
- Al-Soud,W.A. and Radstrom,P. (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 485–493.
- Radstrom,P., Knutsson,R., Wolffs,P., Lovenklev,M. and Lofstrom,C. (2004) Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.*, **26**, 133–146.
- McTigue,P.M., Peterson,R.J. and Kahn,J.D. (2004) Sequence-dependent thermodynamic parameters for locked nucleic acid (LNA)-DNA duplex formation. *Biochemistry*, **43**, 5388–5405.
- Owczarzy,R., Moreira,B.G., You,Y., Behlke,M.A. and Walder,J.A. (2008) Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry*, **47**, 5336–5353.
- Kainz,P. (2000) The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations. *Biochim. Biophys. Acta*, **1494**, 23–27.
- Gevertz,J.L., Dunn,S.M. and Roth,C.M. (2005) Mathematical model of real-time PCR kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, **92**, 346–355.
- Raja,S., El-Hefnawy,T., Kelly,L.A., Chestney,M.L., Luketich,J.D. and Godfrey,T.E. (2002) Temperature-controlled primer limit for multiplexing of rapid, quantitative reverse transcription-PCR assays: application to intraoperative cancer diagnostics. *Clin. Chem.*, **48**, 1329–1337.
- Schmid,N. and Behr,J.P. (1991) Location of spermine and other polyamines on DNA as revealed by photoaffinity cleavage with polyaminobenzene diazonium salts. *Biochemistry*, **30**, 4357–4361.
- Schmid,N. and Behr,J.P. (1995) Recognition of DNA sequences by strand replacement with polyamino-oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1447–1450.
- Corey,D.R. (1995) 48000-fold acceleration of hybridization by chemically modified oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9373–9374.
- Iyer,M., Norton,J.C. and Corey,D.R. (1995) Accelerated hybridization of oligonucleotides to duplex DNA. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14712–14717.
- Christensen,U., Jacobsen,N., Rajwanshi,V.K., Wengel,J. and Koch,T. (2001) Stopped-flow kinetics of locked nucleic acid (LNA)-oligonucleotide duplex formation: studies of LNA-DNA and DNA-DNA interactions. *Biochem. J.*, **354**, 481–484.
- Hilscher,C., Vahrson,W. and Dittmer,D.P. (2005) Faster quantitative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e182.
- Bustin,S.A. and Nolan,T. (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.*, **15**, 155–166.
- Curry,J., McHale,C. and Smith,M.T. (2002) Low efficiency of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase during reverse transcription of rare t(8;21) fusion gene transcripts. *Biotechniques*, **32**, 768, 770, 772, 754–765.
- Karrer,E.E., Lincoln,J.E., Hogenhout,S., Bennett,A.B., Bostock,R.M., Martineau,B., Lucas,W.J., Gilchrist,D.G. and Alexander,D. (1995) In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 3814–3818.
- Levesque-Sergerie,J.P., Duquette,M., Thibault,C., Delbecchi,L. and Bissonnette,N. (2007) Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol. Biol.*, **8**, 93.

Supplementary figure



Target or control genomic DNA was amplified following an annealing temperature gradient procedure (Bio-Rad iCycler) with DNA-E7 (panel A, upper lanes), LNA-E7 (panel A, medium lanes) or ZNA-E7 (panel A, lower lanes) primer pairs (100 nM each) ; with DNA-L1 (panel B, upper lanes), LNA-L1 (panel B, medium lanes) or ZNA-L1 primer pair (500 nM each) containing 4 spermines (panel B, medium lanes) or 5 spermines (panel B, lower lanes). Each sample was amplified in the presence of 10 ng genomic DNA, 10 mM Tris-HCl (pH9), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 μM dNTP (each) and 0.04 U/μl of EconoTaq DNA Polymerase (Lucigen). Cycling protocol was 94°C (20 s), annealing (20 s), 72°C (15 s) x 28 cycles (A) or 30 cycles (B). Final reactions were analysed on 4% agarose gel (Seakem LE, Cambrex) stained with ethidium bromide.

1. Résultats, discussion.

Les tampons des kits PCR sont très riches en magnésium, cation divalent nécessaire à l'activité des polymérases. Malgré tout, les fortes concentrations en magnésium ont pour but de diminuer les répulsions électrostatiques entre une amorce standard et sa séquence complémentaire. Cependant si le magnésium est utilisé en excès, l'hybridation aspécifique va augmenter. Nous nous sommes demandé si dans le cas des ZNAs le domaine oligospermine peut jouer le même rôle que le magnésium. Nos essais d'amplification montrent que les amorces ZNAs, contrairement aux amorces non modifiées nécessitent une faible concentration en magnésium pour être efficaces. En revanche l'utilisation d'une forte concentration de $MgCl_2$ avec les amorces ZNAs conduit à une amplification non spécifique et conduit également à la formation de dimères d'amorces. L'ajout de magnésium n'est pas nécessaire pour favoriser l'hybridation des amorces ZNAs.

Un autre résultat important est le fait que les amorces ZNAs peuvent être utilisées à des températures d'hybridation plus élevées que les amorces non modifiées, sans diminuer l'efficacité de l'amplification PCR. La température de fusion des amorces ZNAs n'est pas séquence dépendante contrairement aux amorces portant des LNAs et peut être prédite (Noir et al. 2008). La température de fusion augmente en fonction du nombre d'unités de spermine greffées à l'amorce ZNA. Malgré tout, elle est également dépendante de la concentration en sel et du pH de la solution. En effet, plus la concentration en sel est faible et plus l'impact des unités de spermine sur la T_m est fort. Dans le cas contraire, de fortes concentrations en sel augmentent le phénomène d'écrantage des charges et diminuent ainsi les interactions électrostatiques et donc l'apport des spermines. Le pH de la solution, lui, peut influencer sur l'état de protonation des spermines. Les tampons PCR sont basiques ce qui réduit l'impact des spermines sur la T_m . Les résultats expérimentaux confirment les calculs théoriques. En effet, d'après la théorie (Noir et al. 2008), pour une amorce de 22-mère portant 4 ou 5 unités spermine la T_m doit être augmentée de 7,6°C à 9,5°C par rapport à une amorce non modifiée (modèle issu de mesures de T_m faites dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4). Les résultats sont relativement en accord avec la théorie, puisque l'augmentation de T_m obtenue est comprise entre 6°C et 8°C dans un tampon Tris 10 mM, NaCl 50 mM et $MgCl_2$ 3 mM, pH 8,4). Ces observations confirment que la longueur de l'oligonucléotide et le nombre de spermine sont les deux paramètres principaux impactant le « design » des amorces ZNAs.

Habituellement, pour une amorce PCR non modifiée, le choix de la séquence est très important puisque qu'elle doit être assez riche en bases G et C afin que la température d'hybridation soit suffisamment élevée pour les conditions expérimentales en PCR. Nous avons montré que les amorces ZNAs permettent de travailler dans des conditions de PCR standardisées et permettent également de s'affranchir du pourcentage de bases G et C de l'amorce. En effet nous avons montré qu'il était possible d'utiliser des amorces ZNAs à une température d'hybridation de seulement 60°C, de façon relativement indépendante de la séquence, et d'obtenir des rendements d'amplification comparables à une amorce standard contenant 50% de bases G et C. Par conséquent, les ZNAs permettent de réaliser des réactions de PCR dans des conditions standards en utilisant des séquences d'amorces riches en bases A et T, normalement peu stables.

Les amorces ZNAs s'avèrent également être très efficaces pour détecter les séquences cibles qui sont présentes dans les échantillons en faible concentration, ce qui prouve leur grande affinité. En effet, elles permettent de détecter des cibles à des concentrations d'amorce 10 fois moins importantes que celles utilisées comme seuil de détection pour les amorces non modifiées et les amorces LNAs.

Un autre avantage démontré par les amorces ZNAs est leur capacité à améliorer la sensibilité de détection lors de la phase exponentielle de la réaction de PCR lorsque la séquence cible est abondamment présente en solution. Nous avons émis l'hypothèse qu'en solution, la concentration des amorces ZNAs est localement augmentée à proximité des séquences cibles. Ceci s'explique par le fait que les amorces ZNAs ont une grande affinité pour l'ADN. Pour prouver ceci, des essais d'amplification ont été réalisés en diminuant le temps d'hybridation. Les résultats montrent que l'hybridation des amorces ZNAs est beaucoup plus rapide que l'hybridation des amorces non modifiées et des amorces LNAs. Cette augmentation de cinétique d'hybridation a déjà été observée dans le cas des amorces PNAs. Cette augmentation de la performance d'amplification et de la vitesse d'hybridation en comparaison aux amorces non modifiées et LNAs permet donc une détection rapide tout en réduisant le temps des cycles de PCR. D'une manière générale, l'utilisation des amorces ZNAs permet donc de diminuer le temps de la réaction d'amplification.

La réaction de polymérase en chaine de transcription inverse est très utilisée dans la plupart des techniques permettant de quantifier l'expression d'un gène. Les amorces ZNAs ont également prouvé leur efficacité pour ce type de PCR de par leur capacité à amplifier des cibles très peu concentrées. La faible efficacité de l'enzyme transcriptase inverse est estimée à 20% et chute encore si la quantité d'ARN à transcrire est faible. Cependant l'utilisation d'amorces ZNAs permet d'augmenter les rendements de transcription de l'ARN en ADN complémentaire. Ce résultat est particulièrement intéressant dans le cas où l'ARN cible est en faible concentration puisque la précision de la quantification relève du compromis entre la variabilité de l'amplification et la quantité de la séquence cible.

Enfin, des essais de transcription inverse ont été réalisés avec des concentrations croissantes en magnésium montrant que plus la concentration en magnésium est élevée et plus l'efficacité des amorces non modifiées diminue, conduisant à d'importantes variations lors de la quantification de l'expression du gène cible. Cette constatation suggère que la variation en magnésium interfère avec l'efficacité de la transcriptase inverse et cela peut conduire à l'obtention de résultats inexacts entre différents essais. En revanche, la transcription inverse réalisée avec des amorces ZNAs n'est pas affectée par la variation de la concentration en magnésium et permet donc d'obtenir une quantification du gène cible plus précise.

2. Conclusion.

Les amorces ZNAs se révèlent simples à « designer ». Elles ont une meilleure affinité pour leurs séquences cibles tout en restant spécifiques. Cette étude prouve que les ZNAs utilisés comme amorces permettent de travailler à des températures d'hybridation élevées, et qu'ils peuvent être utilisés à faible concentration de magnésium. Cette étude a également montré que les amorces ZNAs peuvent être utilisées avec des cycles de PCR raccourcis.

Lorsqu'elles sont utilisées pour la réaction de transcription inverse, elles permettent d'augmenter les rendements d'ADN complémentaire produit.

D. LES SONDAS D'HYDROLYSE ZNAS.

1. Généralités.

Une sonde d'hydrolyse ZNA est constituée d'une séquence de bases ADN, de quelques unités de phosphospermine, d'un fluorophore et d'un « quencher » : FAM -ADN_n-Z_m -BHQ₁ (FAM : 6-carboxyfluorescéine ; BHQ₁ : Black Hole Quencher 1) où m est le nombre d'unités de spermine et n est le nombre de bases ADN. Le principe des sondes d'hydrolyse repose sur la présence d'un fluorophore et d'un « quencher » de part et d'autre de la sonde. Lorsqu'ils sont proches, le « quencher » est capable de capter le photon émis par le fluorophore, et plus ils sont proches et plus le « quenching » est important.

Les sondes d'hydrolyse sont utilisées en combinaison avec une amorce de PCR. L'amorce vient s'hybrider sur sa séquence complémentaire sur le brin à amplifier et un peu plus loin sur le même brin c'est la sonde qui s'hybride à sa séquence complémentaire ([Figure 68 a](#)). Ensuite, l'enzyme ADN polymérase démarre l'amplification du brin en utilisant l'amorce. Lorsque l'enzyme rencontre la sonde, elle coupe les nucléotides proches du fluorophore grâce à son activité d'exonucléase. Le fluorophore est alors libéré dans la solution, il n'est donc plus éteint par le « quencher » et émet de la fluorescence. Le signal de fluorescence émis est donc proportionnel au nombre de brins amplifiés.

Les sondes d'hydrolyse ZNAS tout comme les amorces ZNAS ont une grande affinité pour leurs cibles. La partie poly-spermine chargée positivement permet un repliement de la sonde sur la partie ADN chargée négativement. Ce repliement permet au « quencher » de se rapprocher du fluorophore ce qui induit un meilleur quenching ([Figure 68 b](#)) par rapport aux mêmes sondes sans le fragment poly-spermine. Ce rapprochement fluorophore/ « quencher » se traduit par une diminution du bruit de fond de fluorescence intrinsèque des sondes ([Figure 68 c](#)). Cette réduction du bruit de fond permet d'augmenter le signal de fluorescence émis par les sondes d'hydrolyse ZNAS augmentant ainsi la sensibilité et la gamme dynamique de l'essai.

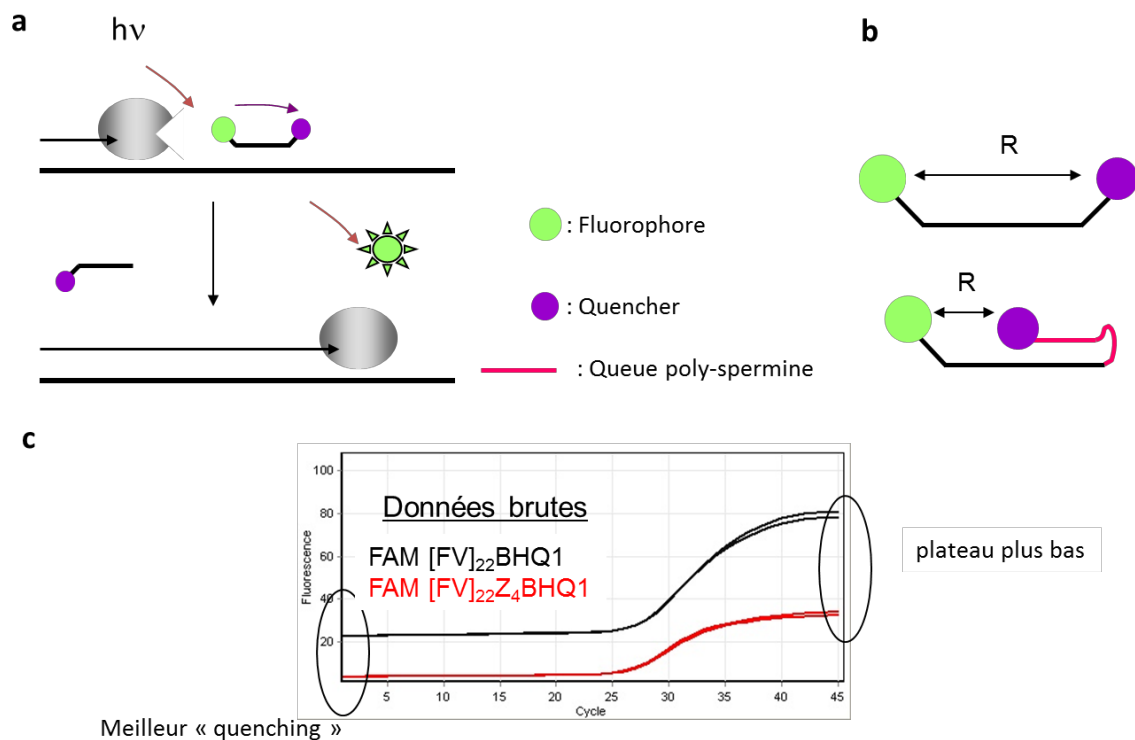


Figure 68 : Hybridation moléculaire et sonde d'hydrolyse PCR.

Les sondes d'hydrolyse pourraient être encore améliorées si elles étaient synthétisées à partir de la spermine phosphoramidite en C₃. En effet, la dégradation des sondes produites à partir du synthon spermine C₄ au cours de l'essai de PCR (milieu basique et température élevée) serait diminuée. Cependant dans nos conditions d'utilisation, les sondes produites avec le synthon spermine C₄ mises en contrôle sans la polymérase dans l'essai ne montrent pas de dérive significative du signal de fluorescence, démontrant ainsi une stabilité nécessaire et suffisante.

2. Synthèse des sondes d'hydrolyse ZNAs.

Les conditions de synthèse des sondes d'hydrolyse ZNAs sont les mêmes que celles de la synthèse des amorces ZNAs. Cependant, la synthèse est initiée à partir du « quencher » (BHQ-1) greffé sur la résine CPG. Les phosphospermines, les bases et le fluorophore sont introduits ensuite successivement. Contrairement aux amorces ZNA, les sondes d'hydrolyse ZNAs ne peuvent être purifiées sur des cartouches de phase inverse C₁₈ car elles ne portent pas de groupements diméthoxytrityles finaux permettant d'être retenues sur la phase inverse. Les sondes ZNAs sont donc purifiées sur une colonne HPLC échangeuse d'anions (IEX-HPLC), en utilisant un gradient en sels (NaCl). Les sondes sont ensuite dessalées sur des colonnes de gel filtration de type Séphadex. Elles sont ensuite caractérisées de la même manière que les amorces ZNAs par spectrométrie de masse Esi-Tof ou Maldi-Tof.

E. UTILISATION DES SONDAS D'HYDROLYSE ZNAS EN PCR.

Notre deuxième article porte sur l'utilisation des ZNAs comme sonde d'hydrolyse de PCR. Le but de cet article est de montrer que les sondes d'hydrolyse ZNAs peuvent être utilisées en PCR quantitative.

Pour cela, nous avons cherché à montrer que la spécificité des sondes d'hydrolyse ZNAs pour leurs cibles était conservée tout en introduisant un mésappariement aléatoirement dans la séquence. Nous avons également montré que l'utilisation des ZNAs permettait de réduire la taille des sondes pouvant améliorer le génotypage du polymorphisme du simple nucléotide.

Un autre objectif de cette deuxième publication est de montrer que les sondes ZNAs permettent de réduire le bruit de fond du signal fluorescent en comparaison aux sondes standards. Comme dans le premier article dans lequel les amorces ZNA étaient comparées aux amorces LNAs et amorces MGBs (pour Minor Groove Binder), les sondes d'hydrolyse sont comparées aux sondes LNAs et aux sondes MGBs.

Zip nucleic acids are potent hydrolysis probes for quantitative PCR

Clément Paris, Valérie Moreau, Gaëlle Deglane, Emilie Voirin, Patrick Erbacher and Nathalie Lenne-Samuel*

Received November 3, 2009; Revised December 15, 2009; Accepted December 17, 2009

ABSTRACT

Zip nucleic acids (ZNAs) are oligonucleotides conjugated with cationic spermine units that increase affinity for their target. ZNAs were recently shown to enable specific and sensitive reactions when used as primers for polymerase chain reaction (PCR) and reverse-transcription. Here, we report their use as quantitative PCR hydrolysis probes. Ultraviolet duplex melting data demonstrate that attachment of cationic residues to the 3' end of an oligonucleotide does not alter its ability to discriminate nucleotides nor the destabilization pattern relative to mismatch location in the oligonucleotide sequence. The stability increase provided by the cationic charges allows the use of short dual-labeled probes that significantly improve single-nucleotide polymorphism genotyping. Longer ZNA probes were shown to display reduced background fluorescence, therefore, generating greater sensitivity and signal level as compared to standard probes. ZNA probes thus provide broad flexibility in assay design and also represent an effective alternative to minor groove binder- and locked nucleic-acid-containing probes.

INTRODUCTION

The invention of polymerase chain reaction (PCR) in the 1980s has revolutionized research, diagnostics, medicine and forensics (1). With the development of quantitative PCR (qPCR), the technology has become quantitative and accurate (2). A target nucleic acid is detected by monitoring in real time the fluorescence generated either by an intercalating dye that quantifies the accumulation of double-stranded DNA or by a probe that hybridizes to the amplicon (3). Although more expensive, probe-based detection confers a higher specificity and provides the possibility to implement multiplex PCR or allelic discrimination. Among the numerous probe types available, dual-labeled probes are the most widely used in qPCR

(4,5). They consist of oligonucleotides with a fluorophore and a quencher dye attached at either end. Dual-labeled probe detection relies on the existence of distinct fluorescence emission levels associated with the free and hybridized states and it is mediated by Förster resonance energy transfer (FRET). Indeed, prior to hybridization, reporter and quencher can come close to each other due to the random-coil configuration of the oligonucleotide probe or can be kept in proximity through formation of a hairpin stem as in molecular beacons (5). The average distance between the dyes is of prime importance for detection sensitivity since it determines both quenching efficiency and background fluorescence of the probe. When the probe hybridizes to the target amplicon, helix formation maintains the reporter and the quencher at a large distance from each other with concomitant fluorescence increase. The maximal fluorescence intensity is reached when the fluorophore is cleaved from the probe by the 5' nuclease activity of the polymerase (4,6). Dual-labeled probes undergoing this degradation process are referred to as 'hydrolysis probes'.

Reducing the probe length has become crucial to increase the discrimination in single-nucleotide genotyping, as well as to provide design flexibility for difficult targets. However, probe shortening decreases melting temperature (T_m), precluding efficient probe binding at PCR cycling temperatures. The introduction of chemical modifications that increase probe stability, such as a minor groove binder (MGB) moiety (7,8) peptide nucleic acid (PNA) backbones (9) or locked nucleic acid (LNA) analogs (10), has enabled efficient short PCR probes to be generated. Zip nucleic acids (ZNAs) are oligonucleotides conjugated with repeated cationic spermine units (11,12) that decrease electrostatic repulsions with target nucleic acid strands. The number of cationic units attached at any position of the oligonucleotide modulates the global charge of the molecule, thus raising the corresponding duplex T_m in a smooth, linear and predictable manner (13). We have recently reported the use of ZNAs as specific primers for PCR and reverse transcription (14). ZNAs enable fast and accurate detection of rare targets, and allow efficient PCR or reverse-transcription reactions

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 9040 6180; Fax: +33 3 9040 6181; Email: nlenne@polyplus-transfection.com

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

© The Author(s) 2010. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

at high annealing temperatures, low primer concentrations, low magnesium and using fast protocols. Another valuable application for ZNA oligonucleotides could be as PCR probes, in particular, short hydrolysis probes. Here, we report that ZNAs are indeed potent short dual-labeled probes with enhanced discrimination level. Interestingly, we also found that cationic spermine unit conjugation improves the performances of longer probes as well, by decreasing the fluorescence background.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides

ZNA oligonucleotides were synthesized on a standard oligonucleotide synthesizer as previously described (11,12) and DMT-ON purified on reverse-phase Poly-Pak II cartridges (Glen Research, Sterling, VA, USA). Standard and ZNA dual-labeled probes were synthesized following the same procedure using BHQ1-CPG resin supports (Biosearch Technologies, Novato, CA, USA). 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) phosphoramidite (Glen Research) was used to introduce the 5'-reporter dye. After ammonia deprotection at room temperature, probes were purified by anion-exchange HPLC under basic conditions as previously described (11,12). Dual-labeled probes and ZNA oligonucleotides were characterized by anion-exchange HPLC and ESI-TOF mass spectrometry.

Unmodified oligonucleotides were from Eurogentec (Seraing, Belgium). Primers were DMT-ON purified and oligonucleotides for T_m studies were purified by HPLC.

The TaqMan MGB probe was from Applied Biosystems (appliedbiosystems.com) and LNA probes were from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA).

T_m measurements

Melting temperature studies were carried out in 1-cm path-length quartz cells on a CARY 100 Bio UV/Visible spectrophotometer (Varian, France) by measuring the absorption at 260 nm. The samples were placed in a CARY Thermostatable Multicell Holder accessory and the temperature was regulated by a CARY Temperature controller by Peltier effect. Samples consisted of single-stranded oligonucleotides mixed in 1:1 molar ratio in a typical PCR buffer containing 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl and 10 mM Tris-HCl (pH 8.5 at 25°C). The final oligonucleotide concentration was 2 μM. Samples were denatured by heating to 95°C at a rate of 1°C/min and maintained at this temperature for 20 min. Annealing was performed by cooling samples to 20°C at a cooling rate of 0.7°C/min and duplexes were maintained 15 min. Melting was performed by heating samples from 20 to 90°C at rate of 0.7°C/min and absorbance at 260 nm was recorded every 0.5 s. T_m values were determined by calculating the second derivative of the absorbance versus temperature curve and subsequent determination of the null. Measurements were repeated at least twice and the average deviation was ±0.2°C.

Genomic DNA extraction

Total DNA was isolated from A549 cells (lung carcinoma, ATCC CCL-185) which are wild-type for the factor V gene, and from factor V-deficient cells (GM14899, Coriell Institute, Camden, NJ, USA) containing the G1691A mutation, using the DNAeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. DNA purity and concentrations were assessed by agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometry. Aliquots were stored at -20°C for long-term and +4°C for short-term use.

qPCR

All qPCR reactions were performed in a final volume of 10 μl in a Rotor-Gene 6000 instrument (corbettlifescience.com). Unless specified otherwise, the final reaction mixtures were composed of 2.5 μl Sensimix NoRef PCR kit (Quantace, London, UK), 3 mM MgCl₂, 10 ng of DNA, 200 nM of each primer and 200 nM probe. Salmon sperm DNA (Invitrogen.com) was used to spike diluted target genomic DNA and as negative control. Results shown are representative of at least three independent experiments.

All the studies were performed in accordance with Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR Experiments (MIQE) guidelines (15).

RESULTS AND DISCUSSION

To address the performances of ZNA probes, we implemented a qPCR assay aiming to genotype the human blood coagulation factor V gene at position 1691. In this locus, the mutation G1691A, referred to as Factor V Leiden mutation, is a highly prevalent single-nucleotide polymorphism (SNP) that confers an increased genetic risk for venous thrombosis (16,17). Among numerous DNA tests developed so far to evaluate the predisposition of individuals to this hemostatic disorder, we have adapted a 5' nuclease assay originally designed to be used with a short 17-base-long hydrolysis probe conjugated with an MGB (Table 1) (18). We synthesized a standard (unmodified) and a ZNA dual-labeled probe with the same sequence, replacing for the latter probe the MGB moiety by four cationic units. In order not to interfere with the exonuclease activity of the polymerase, the cationic units (Z units) were attached at the 3' end. Prior to studying ZNA probe performance in qPCR, T_m measurements were carried out in order to investigate the impact of spermines on mismatch discrimination.

Mismatch discrimination

The mismatch discrimination ability of a probe relies upon the difference in melting temperatures (ΔT_m) between perfect-match and single-base-pair mismatched probe-target duplexes. The greater the difference, the more discriminant the probe is. Furthermore, the shorter the probe, the more a mismatch destabilizes the duplex. Consequently, the ΔT_m is higher when the probe size decreases. ΔT_m also depends on the nature of the

Table 1. Sequences of primers and hydrolysis probes (18)

Factor V gene	NCBI Accession number: NM_000130 5'-3' sequences	Size (bases)
Primers		
Forward	GCCTCTGGGCTAATAGGACTACTT (exon 10)	24
Reverse	TCTGAAAGGTTACTTCAAGGACAA (intron 10-11)	25
Dual-labeled probes	junction exon10-intron 10-11	
DNA -17	FAM-ACCTGTATTCTCGCCT-BHQ1	17
ZNA -17	FAM-ACCTGTATTCT <u>C</u> GCCT-Z ₄ -BHQ1	17
4LNA -17	FAM-ACCTG+TATCC+T+ <u>C</u> +GCCT-BHQ1	17
5LNA -17	FAM-ACCTG+TAT+TCC+T+ <u>C</u> +GCCT-BHQ1	17
MGB-17	FAM-ACCTGTATTCTCGCCT-MGBnfq	17
DNA -22	FAM-ACCTGTATTCTCGCCTGTCCA-BHQ1	22
ZNA -22	FAM-ACCTGTATTCT <u>C</u> GCCTGTCCA- Z ₄ -BHQ	22
DNA -33	FAM-ACCTGTATTCTCGCCTGTCCAGGGATCTGCTC-BHQ1	33
ZNA -33	FAM-ACCTGTATTCTCGCCTGTCCAGGGATCTGCTC- Z ₄ BHQ1	33

Z_n denotes n spermine cationic units.
+N denotes LNA nucleotide.

The SNP position is underlined.

mismatch, the neighboring bases and the mismatch position along the probe sequence, the largest effect being generally achieved at central positions. To investigate whether the presence of spermine units affects these properties, the sequence corresponding to the probe used in the qPCR assay was chosen as a standard oligonucleotide and the corresponding ZNA was synthesized with four cationic units at the 3' end. Melting temperatures of duplexes formed by the standard and ZNA oligonucleotides with the complementary oligonucleotide were measured in a PCR buffer containing Tris-HCl 10mM pH 8.5, KCl 50mM and MgCl₂ 3mM. The matched ZNA duplex exhibited a 2.5°C T_m increase compared to the standard duplex. This rather limited T_m increase does not reflect the stabilization during PCR since cation conjugation has a much larger impact on T_m when the ZNA hybridizes to a target contained in a longer nucleic acid strand (13). In this situation, indeed cationic units counterbalance a much larger electrostatic repulsion presented by the target strand.

We introduced single-nucleotide changes all along the target oligonucleotide sequence, which led to mismatches at various positions in the probe-target duplex (Figure 1). T_m of mismatch duplexes, containing standard or ZNA oligonucleotide probes, were determined and ΔT_m were calculated by subtracting T_m values from the perfect-match duplex T_m . Within experimental error, data show identical ΔT_m values for both standard and ZNA probes for each mismatch position (Figure 1), demonstrating that ZNA retains full oligonucleotide discrimination capacity. This result strikingly contrasts with those obtained with MGB modification, which reduces ΔT_m except when the mismatch is within the MGB-binding region (8). This finding confers a strong advantage to ZNAs, making probe design much easier. In contrast to LNA modification, we did not observe that ZNA improves discrimination *per se*. However, LNA-containing probe design remains difficult due to T_m variation with sequence, position and number of modifications (19). In conclusion, these results clearly demonstrate that while the attachment of spermine units to oligonucleotides increases the T_m , the

intrinsic oligonucleotide sequence recognition specificity remains unaffected.

Shorter probes for better discrimination

To evaluate ZNAs as probes, wild-type genomic DNA was serially diluted and amplifications were carried out under conditions allowing 5' nuclease degradation using the 17-mer ZNA probe or the standard probe (Figure 2A). As shown by the amplification plot, the ZNA probe allowed sensitive and efficient detection, exhibiting higher signal levels and earlier C_q values than the 17-mer standard probe. Post-PCR melting analysis gave no variation in fluorescence signal with the temperature, and fluorescence accumulation over cycles was similar whether the acquisition was performed after the denaturing step (95°C) or the elongation/polymerization step (60°C) (data not shown). These two observations indicate that ZNA probe-based detection most probably occurs through a 5' degradation mechanism (4,6).

The ZNA 17-mer probe performed much the same as a longer standard probe containing 22 bases (Figure 2B) for detection of the wild-type target. In contrast, due to its shorter length, the ZNA probe showed significantly improved SNP discrimination. Indeed, amplification of the genome containing the Leiden mutation was not detected by the ZNA probe, while the standard probe still displayed a fluorescence signal from the mutant sequence.

The short ZNA probe was then compared to MGB- and LNA-containing dual-labeled probes, maintaining sequence and length identical for all probes. LNA-modified oligonucleotide performances are highly dependent on the number of LNA substitutions, their positioning and the sequence context. The LNA probe design was performed by Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) according to Owczarzy and collaborators (19), which led to two probes comprising four and five LNA moieties which were tested. As shown in Figure 2C, ZNA and MGB probes behaved similarly and provided the best C_q improvement over the standard probe, while both LNA probes exhibited

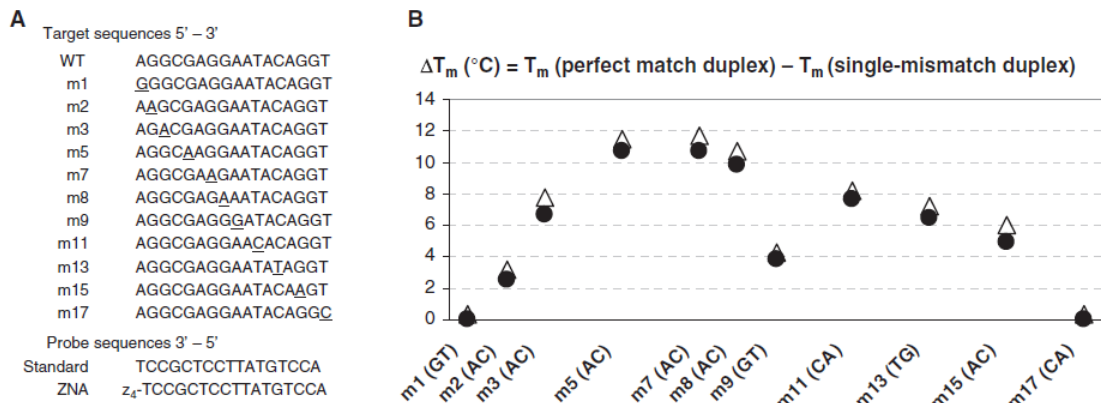


Figure 1. Identical mismatch discrimination of standard DNA and ZNA oligonucleotides for various mismatches located along the duplex. (A) Sequences of target and probe strands used in UV melting experiments. (B) ΔT_m of standard DNA (white triangles) and ZNA oligonucleotide (black circles) as a function of mismatch position.

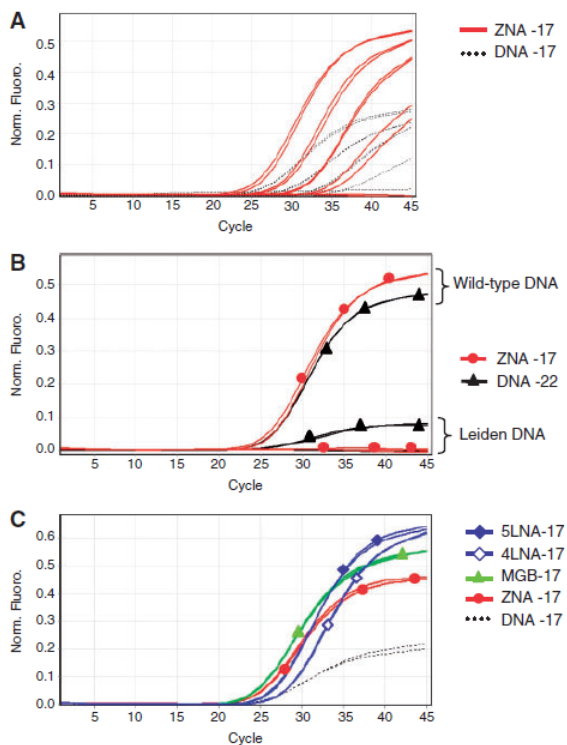


Figure 2. PCR detection and SNP discrimination with short ZNA dual-labeled probe, and comparison with other modified probes. (A) Serial dilution amplifications of target genomic DNA (10 ng to 10 pg) were detected using ZNA short hydrolysis probe (red lines) and its unmodified DNA counterpart (black dotted lines). (B) SNP discrimination. Amplification of 10 ng of wild-type and Leiden genomic DNA were detected using the short ZNA probe (red circle) and a longer unmodified DNA probe. The probes were respectively 17 and 22 bases in length. (C) Amplification of wild-type genomic DNA and detection using short unmodified, ZNA-, MGB- and LNA-containing probes. All probes have identical sequence.

slightly later C_q 's. The comparison was also carried out using different commercial PCR mixes. We observed variations in relative performances of the modified probes depending on the PCR reagent, some being more favorable for one type of modification than another. Nevertheless, for all PCR mixes, ZNA-, MGB- and LNA-containing probes displayed improved performances over the standard probe (data not shown).

Improved quenching

Standard dual-labeled probes are typically 22–25-mer oligonucleotides in order to achieve a T_m value compatible with efficient PCR detection. We addressed the effect of the attachment of spermines on such probes that do not require any T_m increase by comparing 22- and 33-mer standard and ZNA probes. As previously observed for short probes, the conjugation of four cationic moieties at the 3' end of the oligonucleotide provided earlier C_q 's and higher signal levels than standard counterparts for both probes lengths (Figure 3). An examination of raw fluorescence data showed that standard probes exhibited a high background signal. This was expected since the FRET quenching decreases as the distance between fluorophore and quencher increases. Interestingly, both ZNA probes displayed significant reduction of the basal fluorescence emission, which may explain their better performances. Indeed, a lower fluorescence background allowed earlier detection and provided a higher signal-to-noise ratio after normalization by the instrument software. MGB conjugation has been reported to decrease the background fluorescence when adjacent to the fluorophore in 'Pleiades' probes (20), the heterocyclic MGB possibly acting as a quencher itself. Here, the greater quenching efficiency observed for the ZNA probe is presumably due to the oligocationic chain folding back toward the anionic oligonucleotide, thus leading to a shorter end-to-end distance than for the oligonucleotide where internal repulsions lead to an extended conformation (Figure 3C).

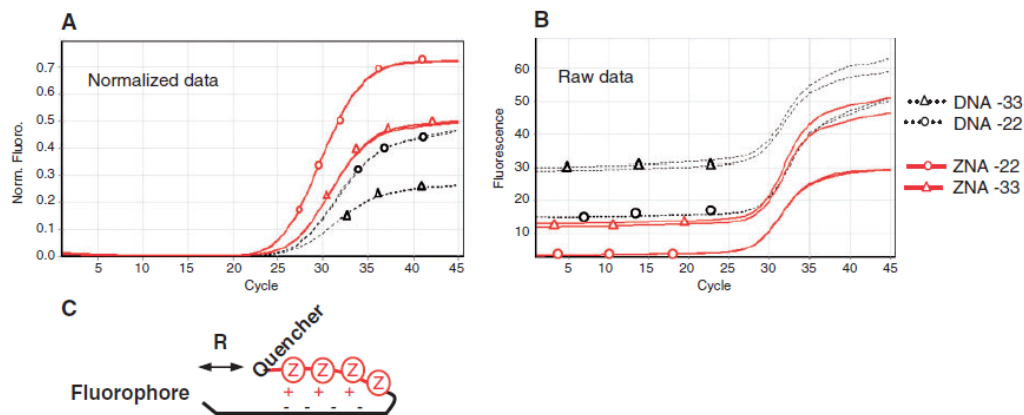


Figure 3. PCR detection with long ZNA dual-labeled probes. Amplifications of 10 ng of target genomic DNA were detected using ZNA hydrolysis probes (red) and their unmodified DNA counterpart (black dotted) containing 22 bases (circle) and 33 (triangle). (A) Normalized data by the instrument's software. (B) Raw fluorescence data. (C) Model for the greater quenching fluorescence of ZNA probes: the cationic charges of spermine units stabilize the probe in a coil conformation, reducing the distance R between the fluorophore and the quencher.

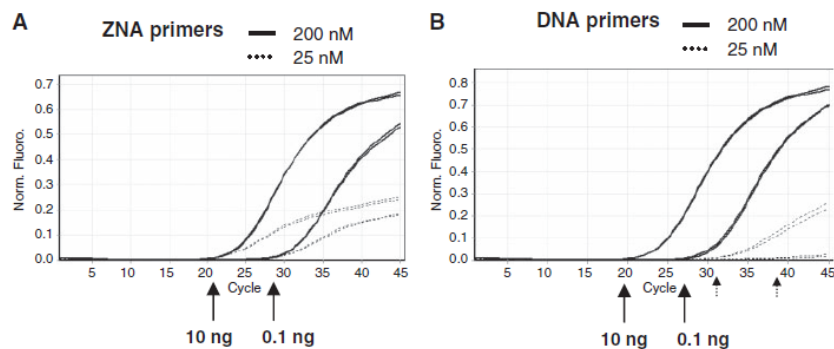


Figure 4. The 5' nuclease assay using low concentration of ZNA and standard primers. Target genomic DNA (10 and 0.1 ng) was amplified with either ZNA primers (A) or standard primers (B). Reactions were performed with 200 nM (thin lines) and 25 nM (dotted lines) of primers, 200 nM of ZNA-22 hydrolysis probe and JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich).

Combining a ZNA probe with ZNA primers

We have recently shown that the use of ZNAs as primers improves PCR in AT-rich regions and provides greater flexibility in PCR and reverse-transcription conditions. Indeed, ZNA primers worked at higher annealing temperatures, in lower and constant magnesium concentration and under fast, time-saving protocols. The most striking advantage was the possibility to substantially decrease the ZNA primers concentration without affecting the C_q , dynamic range, sensitivity or efficiency. Lower primer concentrations allowed early PCR arrest as observed by a low plateau level (14). We suggested that such a property would be of interest for multiplex PCR where multiple target amplification reactions compete for the same, ultimately limiting reagents. Yet, simultaneous detection of several targets in a sample generally requires the use of probes. We therefore performed reactions using ZNAs both as primers and probes. ZNA primers with sequence identical to the standard primer pair were synthesized with four cationic units at their 5' end and used in

conjunction with the 22-mer ZNA probe. As ZNA primers may generate nonspecific amplification products in the presence of high salt (14), reactions were carried out using a commercial kit optimized for probe-based PCR containing 1.5 mM $MgCl_2$. The $MgCl_2$ concentration was increased to 3 mM for the standard DNA primers. Standard DNA primers led to inefficient amplification at 25 nM concentrations as indicated by +10 cycles shift in C_q as compared to 200 nM (Figure 4). In contrast, ZNA primers, although showing different signal intensity, led to the same C_q value at 200 nM and 25 nM concentration, even with a diluted target. This result highlights the potential of ZNAs for use in multiplex PCR applications.

CONCLUSION

The data reported here show that ZNA probes are potent short hydrolysis probes. The presence of cationic residues increases the T_m without affecting the oligonucleotide

discrimination properties, making probe design for genotyping easy. In the present work, four spermine units have been conjugated between the oligonucleotide and the quencher at the 3' end. Several other short hydrolysis probes were synthesized based on the same structure and, in all cases, assays were significantly improved (data not shown). Although more data have to be generated to determine the rules that will define the number of cationic moieties required for a given sequence, ZNA probes are easy to design and straightforward to synthesize. ZNA probes are also easy to use. Indeed, ZNA oligonucleotides were shown to exhibit an outstanding high affinity that may require increasing reaction stringency to maintain specificity (14). This is of prime importance for primers ensuring specific amplification. Here, we show that ZNA probes exhibit high performances under standard concentration conditions and PCR mixes. Finally, we also found that ZNAs improve long hydrolysis probes by decreasing the background fluorescence. This unexpected effect on quenching suggests that ZNAs may provide potent dual-labeled probe that do not function through 5'-nuclease degradation, a hypothesis that is currently under investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We warmly thank Jean-Marc Strub (CNRS, France) for mass spectrometry analysis of ZNA oligonucleotides and probes, Jeanne-Françoise Williamson for critical reading of the manuscript, Jean-Paul Behr for fruitful discussions and Leïla Guerlain for her implication in this work.

FUNDING

The Competitivity cluster Alsace Biovalley, the Ministère de l'Industrie et the Direction Générale des Entreprises (project number 2005-2319-06A-045), the Région Alsace and the Communauté Urbaine de Strasbourg. Funding for open access charge: Polyplus-transfection.

Conflict of interest statement. The authors are employed by Polyplus-transfection SA which has filed patents on the materials or methods described in the present paper, and which offers licenses for ZNA oligonucleotides synthesis and commercialization.

REFERENCES

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350–1354.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, **10**, 413–417.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L. *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.*, **27**, 95–125.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, **4**, 357–362.
- Tyagi, S. and Kramer, F.R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303–308.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. and Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 7276–7280.
- Afonina, I.A., Reed, M.W., Lusby, E., Shishkina, I.G. and Belousov, Y.S. (2002) Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques*, **32**, 940–944, 946–949.
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A. *et al.* (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 655–661.
- Svanvik, N., Stahlberg, A., Sehlstedt, U., Sjoback, R. and Kubista, M. (2000) Detection of PCR products in real time using light-up probes. *Anal. Biochem.*, **287**, 179–182.
- Ugozzoli, L.A., Latorra, D., Puckett, R., Arar, K. and Hamby, K. (2004) Real-time genotyping with oligonucleotide probes containing locked nucleic acids. *Anal. Biochem.*, **324**, 143–152.
- 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.
- Voirin, E., Behr, J.P. and Kotera, M. (2007) Versatile synthesis of oligodeoxyribonucleotide-oligospermine conjugates. *Nat. Protoc.*, **2**, 1360–1367.
- 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. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13500–13505.
- 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. *Nucleic Acids Res.*, **37**, e130.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
- Rees, D.C., Cox, M. and Clegg, J.B. (1995) World distribution of factor V Leiden. *Lancet*, **346**, 1133–1134.
- Rosendaal, F.R., Koster, T., Vandenbroucke, J.P. and Reitsma, P.H. (1995) High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*, **85**, 1504–1508.
- Luderer, R., Verheul, A. and Kortlandt, W. (2004) Rapid detection of the factor V Leiden mutation by real-time PCR with TaqMan minor groove binder probes. *Clin. Chem.*, **50**, 787–788.
- You, Y., Moreira, B.G., Behlke, M.A. and Owczarzy, R. (2006) Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e60.
- Lukhtanov, E.A., Lokhov, S.G., Gorn, V.V., Podyminogin, M.A. and Mahoney, W. (2007) Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e30.

1. Discussion.

Pour évaluer le pouvoir discriminant des sondes d'hydrolyse ZNAs, nous avons effectué des mesures de températures de fusion avec un spectrophotomètre UV et comparé les différences de T_m obtenus entre les sondes complémentaires avec leurs séquences cibles et les sondes hybridées avec des séquences cibles portant un mésappariement.

Pour évaluer l'effet de la position du mésappariement sur le pouvoir discriminant de la sonde, plusieurs séquences cibles ont été synthétisées en faisant varier la position de la base induisant le mésappariement sur toutes les bases de la séquence. Ensuite, des mesures ont été effectuées pour déterminer les T_m des duplexes sonde/séquence complémentaire et sonde/séquence avec un mésappariement. Les résultats montrent que quelle que soit la position du mésappariement la différence de T_m est toujours vérifiée par l'équation :

$$\Delta T_m (^{\circ}\text{C}) = T_m (\text{duplexe complémentaire}) - T_m (\text{duplexe avec un mésappariement})$$

De plus, malgré la présence de mésappariements, les sondes ZNAs sont toujours discriminantes. Ce pouvoir discriminant des sondes d'hydrolyse quelle que soit la position du mésappariement sur sa séquence rend leur « design » beaucoup plus simple que celui des sondes LNAs par exemple. Ces résultats montrent donc que la reconnaissance spécifique des sondes ZNAs n'est pas affectée, malgré l'augmentation de la T_m induite par les unités de spermine.

D'une manière générale, plus les sondes d'hydrolyse sont courtes et plus elles sont discriminantes. Néanmoins plus elles sont courtes et plus leur T_m diminue. Afin d'évaluer l'efficacité des sondes courtes ZNAs, nous avons synthétisé une sonde d'hydrolyse ZNA 17-mère portant 4 unités de spermine, puis nous avons comparé son efficacité à une sonde standard 17-mère. Les résultats montrent que la sonde ZNA permet une détection sensible et efficace de la séquence cible, de plus la sonde ZNA permet d'obtenir un signal plus élevé et une détection plus rapide que la sonde standard 17-mère.

Cette étude nous a permis de montrer que l'efficacité des sondes ZNAs 17-mère est comparable à l'efficacité de sondes standards 22-mère. Les résultats montrent également que les sondes ZNAs 17-mère sont plus discriminantes que les sondes standard 22-mère puisque lors de la détection d'une cible en très faible quantité et portant un mésappariement, les sondes courtes ZNAs 17-mère n'ont induit aucun signal tandis que les sondes standards ZNAs 22-mère, elles ont induite un léger signal.

Les essais réalisés montrent également que les sondes d'hydrolyse ZNAs ont un meilleur « quenching » que les sondes standards, ce qui induit une diminution du bruit de fond. Comme je l'ai présenté dans le paragraphe précédent ceci est dû au fait que les unités de spermine permettent un repliement favorisant un rapprochement entre le « quencher » et le fluorophore. Le quenching de type « FRET » (pour Fluorescence Resonance Energy Transfer) est donc d'autant plus amélioré que le « quencher » se trouve proche du fluorophore.

2. Conclusion.

Les résultats obtenus nous ont donc montré que les sondes d'hydrolyse ZNAs sont particulièrement efficaces. La partie oligospermine permet d'augmenter leur T_m sans diminuer leur pouvoir discriminant, rendant ainsi leur « design » plus simple. La synthèse des sondes d'hydrolyse ZNAs est simple et elles sont faciles à utiliser. Nous avons montré que les sondes ZNAs sont performantes dans des conditions de concentration standard de PCR. Enfin, nous avons montré que les sondes d'hydrolyse ZNAs permettent de diminuer la fluorescence du bruit de fond grâce à leur meilleur « quenching ».

D. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

Le travail sur l'optimisation de la synthèse des ZNAs a permis d'obtenir des rendements de couplage et une purification maîtrisés. La modification du synthon spermine phosphoramidite C_4 initial en C_3 pourrait encore augmenter la stabilité des conjugués oligonucléotide-oligospermine. Cette amélioration de la stabilité autorise l'utilisation d'amidites avec des protections standards pour la synthèse des amorces et des sondes d'hydrolyse PCR.

Le « design » des amorces ZNAs s'avère être simple à réaliser, les résultats obtenus ont permis de montrer qu'elles ont une grande affinité pour leurs séquence cible tout en restant discriminantes envers les mésappariements. Nous avons démontré que les amorces ZNAs permettent de travailler à des hautes températures d'hybridation, avec de faibles concentrations d'amorce, elles permettent également de travailler à faible concentration en magnésium. Les essais réalisés montrent que les résultats, illustrant l'efficacité des amorces ZNAs en transcription inverse sont encourageants, puisqu'ils permettent d'augmenter les quantités d'ADN complémentaire produit.

Les résultats ont également montré que les ZNAs sont efficaces, lorsqu'ils sont utilisés comme sondes d'hydrolyse. Les unités cationiques permettent d'augmenter la température de fusion de la sonde sans altérer ses propriétés discriminantes, ce qui en fait un outil de choix pour le génotypage. Les sondes d'hydrolyse ZNAs, tout comme les amorces ZNAs, ont l'avantage d'être faciles à concevoir et à synthétiser. Les sondes ZNAs sont très facilement utilisables dans des concentrations standards de PCR avec des kits commerciaux. Enfin un des avantages majeur mais inattendu est que le bruit de fond de fluorescence des sondes ZNAs est diminué, ce phénomène étant dû au repliement des unités de spermine sur la partie ADN de la sonde, permettant un meilleur « quenching » entre le fluorophore et le « quencher ».

Ce travail a permis de mieux comprendre l'hybridation des ZNAs et d'en définir le « design » et les conditions d'utilisation, notamment en PCR. D'autres applications des ZNAs en biologie moléculaire sont ouvertes, comme l'hybridation *in situ* ou la purification d'acides nucléiques.

Lors de récents travaux, Trevisan et ses collègues ont utilisé des sondes d'hybridation ZNAs pour détecter *in-situ* des microARNs dans les plantes. Ils ont montré que les sondes ZNAs sont beaucoup plus sélectives et sensibles que les sondes LNAs pour la détection de microARNs (Trevisan et al. 2012).

L'efficacité de la pénétration cellulaire des oligonucléotides est améliorée par la conjugaison d'espèce cationique (Juliano et al. 2008). Cette propriété a été exploitée par l'équipe de Corey qui a évalué l'activité des ZNAs pour des applications antisens et antigène. Ils ont montré *in vitro* que les ZNAs avaient un meilleur impact sur l'activité antisens que les chimères ADN/LNAs lorsqu'ils sont transfectés avec des lipides cationiques.

CHAPITRE 5 : LES CONJUGUES ARN-OLIGOSPERMINE POUR LA THERAPIE.

A. INTRODUCTION.

Depuis la découverte initiale de l'activité d'ARN interférence à partir de duplexes d'oligonucléotides synthétiques dans des cellules eucaryotes (Elbashir 2001), la structure des siRNAs a beaucoup évolué. Des modifications chimiques ont été introduites dans l'objectif de rendre les siRNAs plus résistants vis-à-vis des dégradations, mais également moins immunogènes et plus spécifiques envers leurs cibles. Toutefois, bien que les raisons en soient encore mal comprises, ces modifications chimiques ne sont pas sans conséquence sur l'activité, car elles sont susceptibles d'inhiber l'activité d'interférence, de provoquer des effets non spécifiques («off-target») ou encore d'induire de la toxicité. Si les règles de «design» sont encore mal définies, il convient de limiter les modifications sur le brin antisens, notamment pour ne pas bloquer le groupement phosphate en position 5', nécessaire à l'activité du complexe RISC (pour RNA-Induced Silencing Complex), et de limiter les modifications sur les 10 premiers nucléotides qui sont responsables de la sélectivité vis-à-vis de l'ARN messager cible (Figure 69).

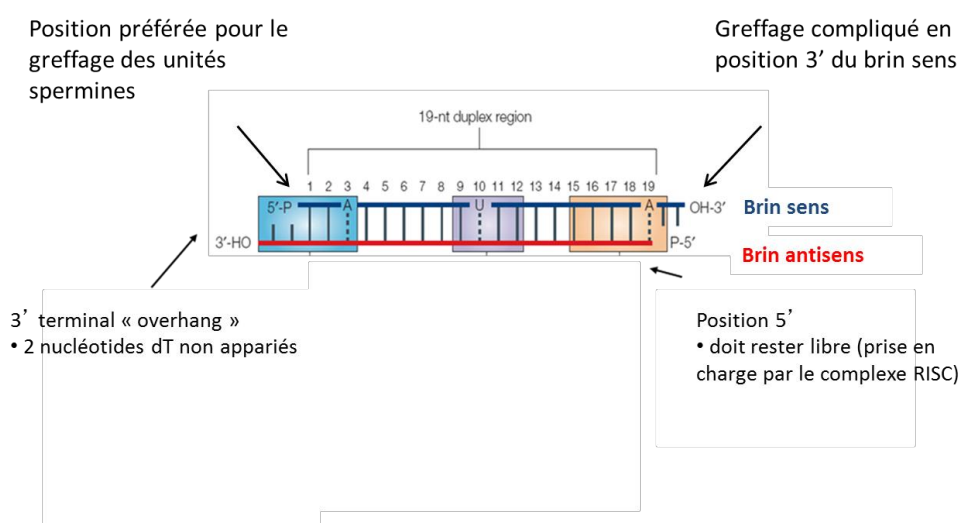


Figure 69 : Structure du duplexe siRNA.

La plupart des modifications chimiques sont introduites sur le brin sens sous la forme de nucléotides modifiés, améliorant la résistance face aux nucléases. Sur les extrémités du brin sens, il est par exemple possible de greffer des molécules permettant d'améliorer le ciblage ou l'entrée cellulaire (cholestérol, peptide, Folate, RGD).

A partir de ce constat, les conjugués cationiques oligonucléotide-oligospermine ont été synthétisés pour pouvoir une fois hybridés à un brin antisens former des duplexes siRNA cationiques que nous appelons SIRNAPLUS. L'ajout d'un nombre suffisant d'unités

cationiques de spermine sur le brin sens ARN permet de générer des siRNAs de charge globale positive.

Comme indiqué précédemment, il a déjà été montré au Laboratoire que les siRNAs cationiques sont capables de pénétrer seuls dans les cellules et d'induire l'extinction d'un gène cible (Nothisen et al. 2009). Cette démonstration n'avait été faite qu'en absence de sérum.

Contrairement à la plupart des autres technologies de vectorisation des siRNAs, les SIRNAPLUS portent intrinsèquement la propriété de pénétrer seuls dans les cellules sans l'aide d'agent de transfection. Supposés être à l'état moléculaire sous la forme de petites molécules, les duplexes SIRNAPLUS sont censés atteindre leurs cibles cellulaires *in vitro* grâce au mouvement brownien et *in vivo* par diffusion leur permettant ainsi d'interagir avec les membranes plasmiques anioniques des cellules *via* leur partie cationique.

L'avantage à utiliser les SIRNAPLUS est qu'il suffira de se procurer directement le siRNA cationique et non plus à la fois le siRNA et l'agent de transfection. Cet avantage est très important pour de potentielles applications thérapeutiques, car il n'y aura plus qu'une seule molécule à produire et injecter.

Dans le contexte *in vivo*, les SIRNAPLUS ne sont plus censés avoir un comportement particulière comme c'est le cas des siRNAs vectorisés par un agent de transfection. Leur utilisation devrait donc permettre de minimiser les problèmes d'agrégations ou de rétentions dans certains tissus.

Le projet de cette thèse s'appuie sur la preuve de concept réalisée au Laboratoire pour éteindre un gène cible grâce à des SIRNAPLUS en absence de sérum. Notre ambition a été d'établir la preuve du concept d'activité des SIRNAPLUS *in vivo*. Une première étape était donc de montrer leur activité *in vitro* en présence de sérum. Mon travail de thèse s'est focalisé sur le développement et l'optimisation de la production des conjugués ARN-oligospermine permettant de former les SIRNAPLUS. La synthèse des conjugués cationiques a été améliorée pour obtenir des rendements de couplage des unités phosphospermines optimaux. Beaucoup d'efforts ont été consacrés sur les étapes de déprotection et purification des brins sens ARNs cationiques qui sont apparues comme les étapes critiques pouvant limiter la qualité et les rendements de production des SIRNAPLUS. Dans ce dernier chapitre du manuscrit, seront présentés les avancements successifs qui nous ont conduits à mieux maîtriser la production des conjugués ARN-oligospermine, les résultats biologiques obtenus avec les SIRNAPLUS, ainsi que les mesures effectuées pour déterminer la taille de ces molécules.

1. La problématique de la vectorisation des siRNAs in vivo.

La diffusion ou vectorisation des petits ARNs interférents dans l'organisme vers les organes et les tissus ciblés est dépendante de la voie d'administration des siRNAs qui peut se faire, soit par voie systémique, soit en injection locale.

L'administration localisée consiste à injecter directement des siRNAs dans le tissu ciblé, comme une tumeur par exemple. Cette méthode d'administration permet aux siRNAs d'être concentrés dans le tissu ciblé et d'être directement en contact avec les cellules cibles. L'injection locale permet également de limiter les doses injectées et donc de réduire les effets secondaires et toxiques. Les tissus comme l'œil, la peau, ainsi que certaines tumeurs font l'objet d'évaluations thérapeutiques à base de siRNAs.

Par opposition, l'administration systémique, comme la voie intraveineuse, implique un premier phénomène de diffusion des siRNAs vers les organes et tissus ciblés. Ce mode d'administration nécessite que les siRNAs ne soient pas éliminés, dégradés ou encore captés par les tissus non ciblés. Beaucoup de tissus peuvent être atteints uniquement par voie systémique, *via* le flux sanguin. Les formulations de siRNAs administrées par voie systémique rencontrent toute une série de barrières biologiques (Figure 70). En effet, les complexes de siRNA injectés doivent diffuser dans le flux sanguin jusqu'aux organes, tout en évitant d'être filtrés par les reins, phagocytés, agrégés par les protéines du sérum ou encore dégradés par les nucléases.

La sortie des siRNAs du flux sanguin à travers l'endothélium vasculaire est un enjeu majeur pour qu'ils soient acheminés vers les différents tissus cibles. En général, des molécules de diamètre supérieur à 5 nm ne peuvent transiter par les capillaires de l'endothélium et restent dans la circulation sanguine jusqu'à leur élimination (Whitehead, Langer, et Anderson 2009). Le foie, la rate et certaines tumeurs peuvent permettre l'entrée d'objets plus gros, comme des particules, qui ont des diamètres allant jusqu'à 200 nm. Après avoir quitté la circulation sanguine les siRNAs, vectorisés ou non, doivent diffuser au travers des matrices extracellulaires, constituées de vastes réseaux de poly-saccharides et de protéines fibreuses, créant des résistances mécaniques supplémentaires à la migration des macromolécules et des nanoparticules vers les cellules cibles (Zámečník et al. 2004). La migration des molécules actives peut donc être diminuée ou arrêtée, ce qui donne une chance supplémentaire aux nucléases et aux cellules phagocytiques de détruire les siRNAs vectorisés sous la forme de nanoparticules. Après avoir été endocytés par les cellules, les siRNAs séquestrés dans des vésicules acides (endosomes, lysosomes) doivent être libérés dans le cytoplasme (Oliveira et al. 2007). Les systèmes particuliers possèdent une activité capable de rompre les membranes des endosomes permettant ainsi la libération des siRNAs dans le cytoplasme. Enfin les siRNAs doivent être accessibles à la machinerie d'ARN interférence, ce qui impose pour les systèmes particuliers une dissociation préalable des siRNAs et des composants de vectorisation.

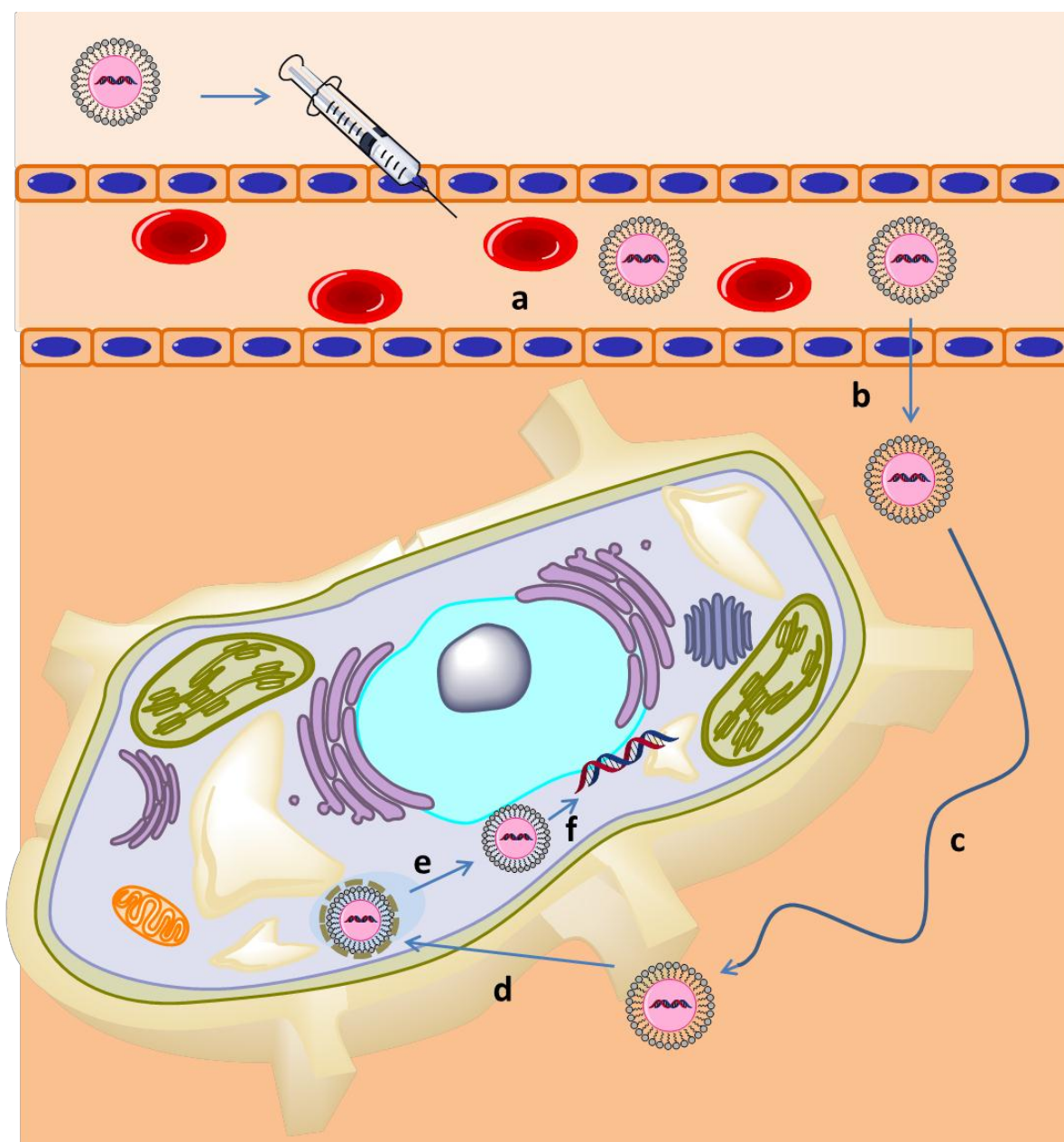


Figure 70 : Barrières extra et intra cellulaires de l'administration par voie systémique des siRNAs. **a-** La nanoparticule injectée doit éviter d'être filtrée, phagocytée ou encore dégradée dans le flux sanguin. **b-** La particule doit traverser la barrière endothéliale vasculaire. **c-** La particule diffuse dans la matrice extracellulaire. **d-** La particule entre dans la cellule par endocytose. **e-** La particule se libère de l'endosome. **f-** La particule se désagrège pour libérer le siRNA qui va induire le mécanisme d'ARN interférence.

Suite à une injection systémique, le facteur limitant des systèmes particuliers de complexation ou d'encapsulation des siRNAs est leur taille trop importante, frein à la diffusion. Le siRNA en tant qu'entité moléculaire possède une taille d'environ 6 nm et constitue donc un objet de taille idéale pour favoriser la diffusion, à condition que l'on puisse l'utiliser tel quel. Malheureusement, les siRNAs nus ne pénètrent pas seuls dans les cellules et sont très rapidement dégradés par les nucléases. Certaines modifications (voir chapitre 2), comme l'addition d'un groupe cholestérol, permettent une légère augmentation de la disponibilité des siRNAs dans l'organisme. C'est pour cette raison qu'il a été imaginé au Laboratoire de synthétiser de petits ARNs interférents sur lesquels sont greffées des unités

de spermine permettant l'obtention de siRNAs cationiques. En effet les siRNAs cationiques conservent une petite taille proche de celle d'un siRNA non modifié et ils peuvent pénétrer sans agent de transfert dans les cellules. En théorie, l'addition d'un nombre de spermines suffisant permet de créer des siRNAs de charge positive qui doivent se répulser et éviter la formation d'agrégats. Ces siRNAs par leur charge positive sont capables d'interagir avec des résidus anioniques des membranes cellulaires, comme les protéoglycanes riches en héparane sulfate. Les SIRNAPLUS pénètrent ensuite dans la cellule puis sont pris en charge par le complexe RISC pour induire le mécanisme d'ARN interférence ([Figure 71](#)).

Pour la problématique *in vivo*, la combinaison de leur petite taille et de leur charge globale positive permettrait aux SIRNAPLUS d'avoir une meilleure diffusion dans les tissus et surtout d'être administrés dans l'organisme sans être préalablement formulés. Habituellement, la formulation des siRNAs avec des polymères ou des lipides cationiques leur permet d'être protégés contre les dégradations. Il conviendra donc d'évaluer la stabilité des SIRNAPLUS vis-à-vis des nucléases ou de savoir si l'introduction de nucléotides chimiquement modifiés sera nécessaire pour éviter leur dégradation.

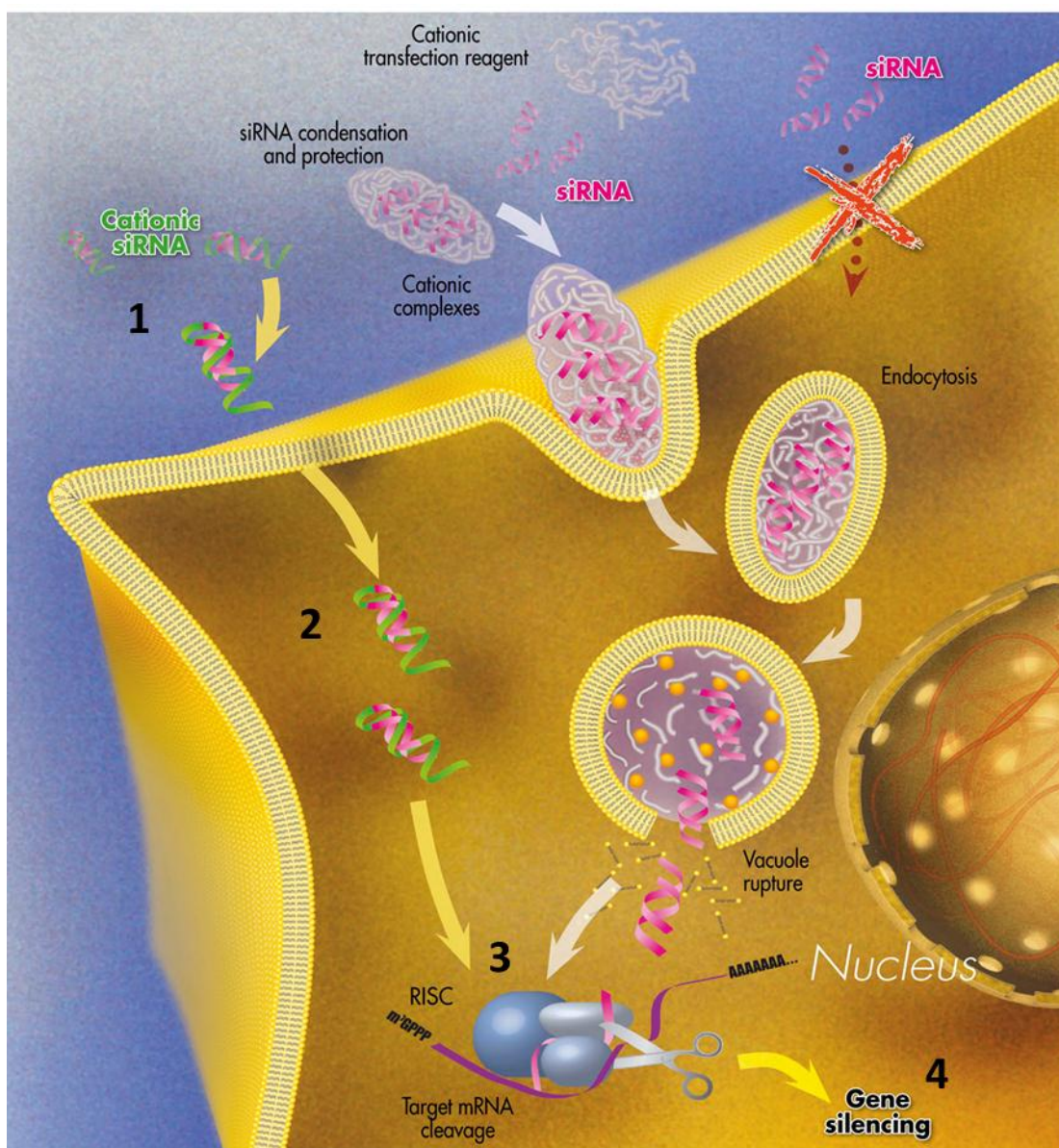


Figure 71 : Mécanisme d'action schématique des SIRNAPLUS dans la cellule. 1 – Diffusion des SIRNAPLUS puis interaction avec la surface de la cellule. 2 – Pénétration cellulaire puis diffusion dans le cytoplasme. 3 – Prise en charge dans RISC puis reconnaissance de l'ARN messager complémentaire. 4 – Clivage de l'ARNm cible par ARN interférence.

B. LA CHIMIE DES CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDE-OLIGOSPERMINE.

1. Généralités.

D'une manière générale, les brins sens des SIRNAPLUS sont synthétisés de la même façon que les ZNAs sur un synthétiseur automatique. Les SIRNAPLUS sont composés d'un brin sens-oligospermine hybridé avec un brin antisens. Les deux brins sont composés de 19 nucléobases de type ARN et nous avons conservé deux bases non appariées aux extrémités 3' de type ADN (2 dT), selon le « design » initial de Tuschl et ses collaborateurs. Ces

« overhangs » sont conservées pour apporter de la stabilité aux duplexes vis-à-vis de la dégradation. Parfois un lien phosphorothioate a été également introduit entre les deux dT, pour les mêmes raisons de stabilité. La phosphospermine est greffée en position 5' du brin sens. Le cycle de synthèse des brins sens-oligospermine est similaire à celui des ZNAs, vu précédemment. Cependant, un temps de couplage plus long pour les bases ARNs que pour les bases ADN standards (Figure 72) est appliqué, 2 min pour les bases ARNs contre 45 sec pour les bases ADN. Le temps de couplage de la phosphospermine est de 5 min. D'autre part, la différence essentielle repose sur le fait que les bases ARNs sont protégées sur leur position 2'-hydroxyle.

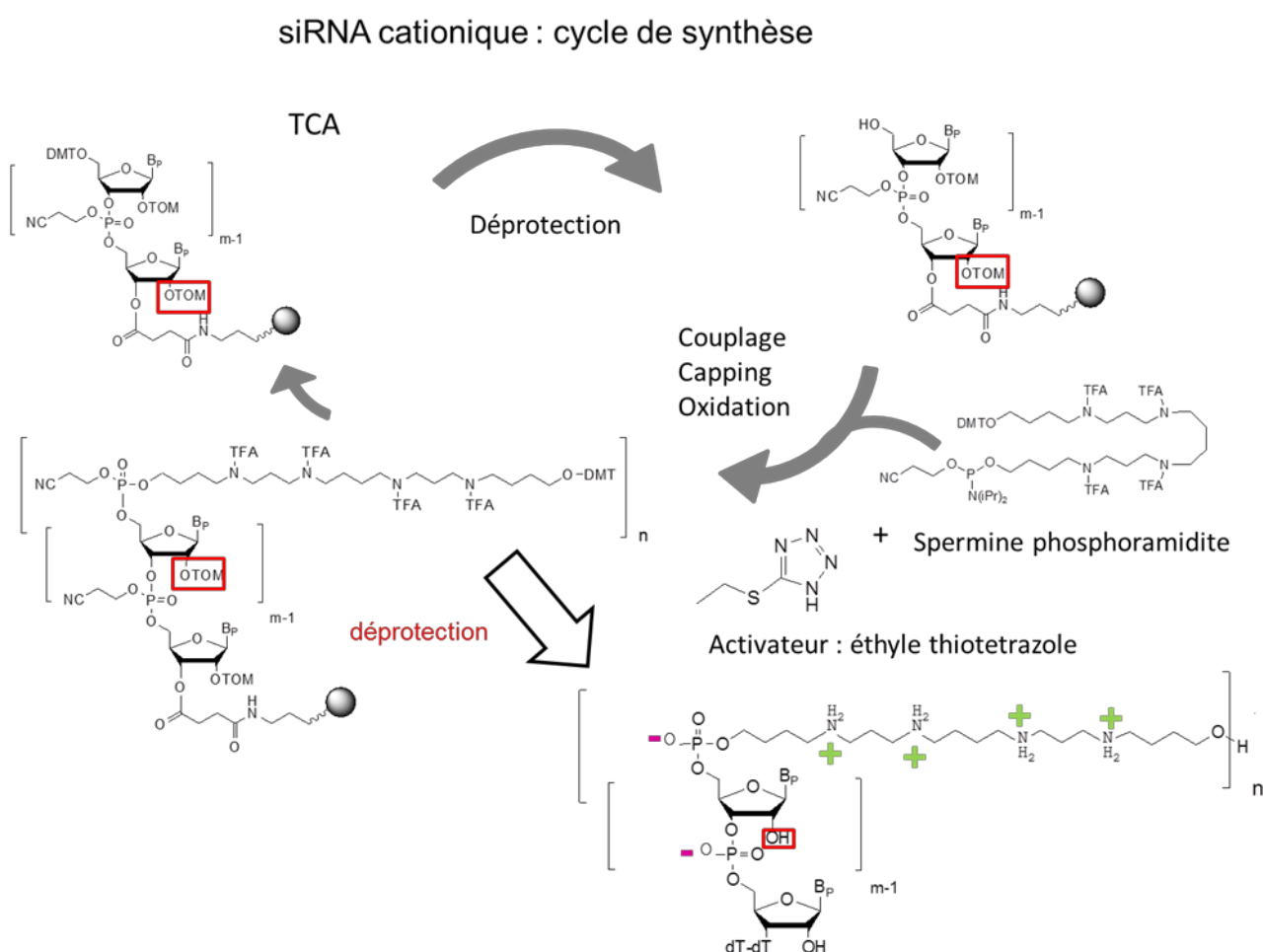


Figure 72 : Cycle de synthèse d'un brin sens-oligospermine. Après avoir synthétisé la partie ARN protégé dont les positions 2' sont protégées avec des groupements TOM (triisopropylsilyloxyméthyle), les unités de spermine sont couplées en position 5' du brin sens.

Plusieurs conjugués ARN-oligospermine contenant de 20 à 35 unités de spermine ont été synthétisés (Figure 73), puis ont été hybridés avec le brin antisens ARN qui porte l'activité biologique pour former un duplexe de siRNA cationique, définissant un SIRNAPLUS.

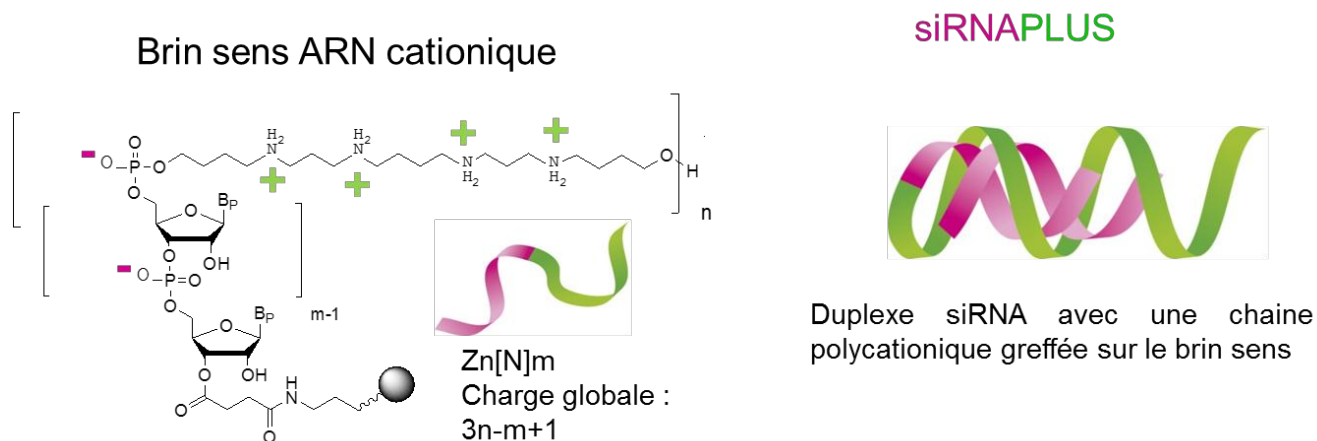


Figure 73 : Structure des SIRNAPLUS.

2. Synthèse du brin sens ARN-oligospermine.

Au début de nos travaux sur les ARNs cationiques, les bases ARNs que nous utilisons pour la synthèse des brins sens cationiques étaient protégées 2'-O-TOM (2'-O-Triisopropylxyméthyle) (Figure 74). Les bases ARN-TOM présentent l'avantage d'être moins encombrées stériquement que les bases ARNs « standards » protégées TBDMS (2'-O-Tert-butylidiméthylsilyle), et de ce fait, conduisent théoriquement à de meilleurs rendements de couplage. L'autre avantage des bases ARN-TOM est le fait qu'elles permettent d'éviter les migrations des positions 2' vers les positions 3' durant la déprotection en milieu basique. Lorsque les groupements protecteurs TBDMS sont utilisés, il arrive que cette migration conduise à la formation de liaison 2'-5' non active biologiquement.

ARN - TOM

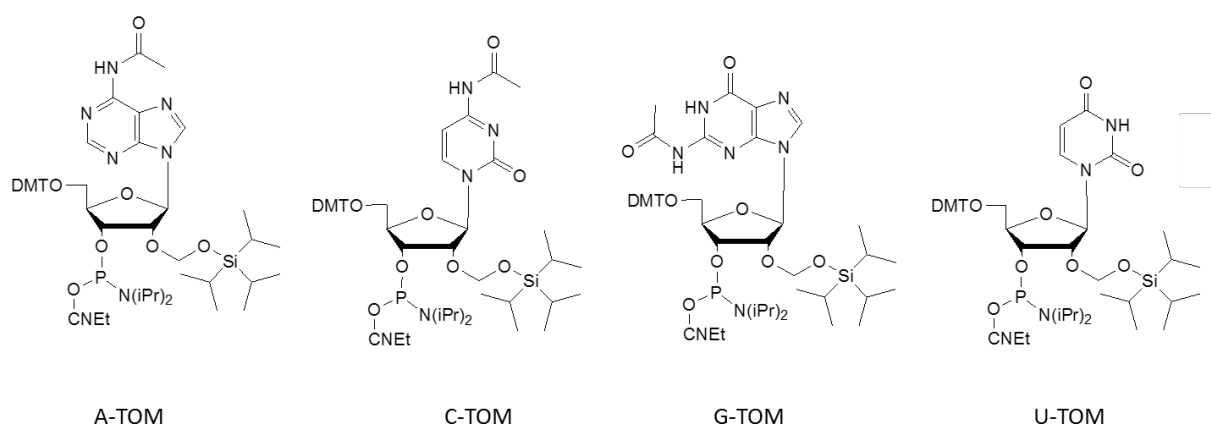


Figure 74 : Structure des bases ARNs phosphoramidite protégées en position 2' avec un groupement TOM (2'-O-TriisopropylOxyMéthyle).

Pour effectuer la synthèse du brin sens ARN cationique, il faut réaliser en moyenne entre 45 et 55 couplages soit 20 couplages pour la partie ARN puis entre 25 et 35 couplages pour la queue oligospermine. Pour espérer obtenir les conjugués ARN-oligospermine les plus purs possibles il faut que les rendements de couplage soient maximaux. Cela réduira la polydispersité des conjugués obtenus. C'est pourquoi, le premier effort s'est porté sur l'optimisation du rendement de couplage de la spermine phosphoramidite.

Lors de nos premiers couplages de spermine phosphoramidite sur les conjugués ZNAs, les rendements étaient proches de 85-90% par couplage pour une échelle de synthèse de 1 μ mole (Tableau 4). Ces faibles rendements étaient sans conséquence sur la pureté des ZNAs puisque comme indiqué précédemment, leur purification sur les cartouches de phase inverse C₁₈ permettait d'éliminer les conjugués tronqués ne portant pas de groupements diméthoxytrityles finaux. De plus, les quantités de ZNAs nécessaires aux études de PCR étaient faibles donc les rendements de synthèse ne nécessitaient pas d'être optimaux.

Les quantités d'oligonucléotides utilisées pour réaliser des expériences d'ARN interférence sur cellules sont beaucoup plus importantes que celles requises en PCR. Les expériences *in vivo* quant à elles requièrent 10 fois plus d'oligonucléotides que les expériences sur cellules. De ce fait, nous avons dû impérativement augmenter les rendements de couplages de la spermine phosphoramidite. Pour cela, nous avons joué sur plusieurs facteurs, allant de la préparation du synthon spermine à l'optimisation du protocole de couplage sur le synthétiseur automatique. Cette optimisation a été faite sur des oligonucléotides 20 dT greffés sur leurs supports solides.

Dans un premier temps nous avons donc travaillé sur la préparation du synthon spermine phosphoramidite. L'eau est l'ennemie numéro un de la chimie des phosphoramidites car elle entre en compétition avec la réaction des couplages des amidites, c'est pourquoi il était impératif de manipuler dans les conditions les plus anhydres possibles. La spermine phosphoramidite se trouve sous forme d'huile, ce qui la rend très difficile à sécher. Donc pour essayer de capter le maximum d'eau une fois que l'amidite a été mise en solution dans de l'acétonitrile anhydre (10-15 ppm H₂O), nous avons ajouté du tamis moléculaire 4 Å et laissé reposer la solution pendant 1 nuit. En suivant cette approche, le rendement de couplage est passé de 85-90% à 90-93% (Tableau 4). Avant d'être utilisé et pour qu'il soit entièrement efficace le tamis moléculaire doit être parfaitement activé. Lors de nos travaux nous avons essayé plusieurs protocoles d'activation. Après avoir activé notre tamis moléculaire au four à micro-ondes, les rendements de couplage de la spermine phosphoramidite sont montés à 94%. Nous ne trouvons pas que cette méthode d'activation était la plus appropriée et nous avons donc activé notre tamis en le chauffant sous vide à 120°C durant 2 jours. Les résultats obtenus sur les rendements de couplages étaient plus significatifs car ils sont montés à 97%. Enfin, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de tamis moléculaire déjà activé, emballé dans des sachets de 1 g à 10 g et conditionnés à l'unité sous vide (« TrapPack »). L'utilisation de ce tamis moléculaire en sachet présente l'autre avantage de ne libérer aucune poussière en solution qui viendrait obstruer les tubulures du synthétiseur. Les rendements de couplages obtenus avec le « TrapPack » sont de l'ordre de 98%, ce qui nous permet de nous approcher du rendement de couplage des phosphoramidites ARN standards.

Dans un deuxième temps, nous avons travaillé sur l'échelle de synthèse des spermines phosphoramidites pour tenter d'améliorer les rendements de couplages. Au départ de nos études, les ZNAs étaient synthétisés à une échelle de synthèse de 1 µmole, nous utilisons 9 équivalents de spermine phosphoramidite par couplage et les rendements atteignaient au maximum 94%. Nous avons ensuite essayé de diminuer l'échelle de synthèse pour augmenter le nombre d'équivalents de spermine phosphoramidite à 18 équivalents, les rendements de couplages sont ainsi montés jusqu'à 97%. Les premiers couplage de la spermine phosphoramidite avaient été effectués sur un synthétiseur d'oligonucléotides datant de 1993 (Millipore Expedite), nous avons ensuite fait l'acquisition d'un synthétiseur neuf (H8-SE K&A) beaucoup plus étanche que l'ancien qui nous a permis d'obtenir des rendements de couplage constants de 98%, avec un protocole optimisé, incluant également l'introduction de la spermine phosphoramidite par intervalle régulier.

Tableau 4 : Etapes d'améliorations du rendement de couplage de la spermine phosphoramidite.

étape		rendements
Préparation synthon	• dilution dans ACN anhydre	85-90%
	• dilution dans ACN anhydre + Tamis moléculaire 4Å	90-93%
	• dilution dans ACN anhydre + Tamis moléculaire 4Å activé (micro-onde)	91-94%
	• dilution dans ACN anhydre + Tamis moléculaire 4Å activé sous vide 120° C	95-97%
	• dilution dans ACN anhydre + Trap Pack	95-98%
Echelle de synthèse	• 1µm soit 9 équivalents (Expedite)	92-94%
	• 0.5 µm soit 18 équivalents (Expedite)	95-97%
	• 0.5 µm soit 18 équivalents (K&A)	96-98%
Temps de couplage	• 15 min Expedite	97%
	• 10 min K & A	97%
Séquence étape de couplage	• 9 volumes directement introduit dans la colonne CPG	98%
	• 6 volumes introduit à intervalles régulier pour ajouter de l'amidite fraîche petit à petit (process expedite) : économie de 1/3 de réactif	98%

3. Déprotection des conjugués oligonucléotide-oligospermine cationiques.

D'une manière générale, la déprotection des oligonucléotides ARN se fait en deux étapes. Lors de la première étape, les protections des nucléobases sont clivées en incubant les oligonucléotides en milieu basique. Lors de la deuxième étape, les groupements protecteurs silylés des positions 2'-OH sont clivés avec une solution fluorée.

Le protocole de déprotection donné par le fournisseur des amidites ARN-TOM (Glen Research) préconise de cliver l'oligonucléotide synthétisé de son support solide en incubant ce dernier avec une solution d'EMAM (méthylamine éthanolique/méthylamine aqueuse 1/1) à température ambiante pendant 20 min, puis de séparer la CPG de la solution de clivage et de laisser la déprotection des nucléobases s'effectuer durant une nuit à température ambiante. Nous suivons ce protocole pour déprotéger nos conjugués ARN-oligospermine mais nous effectuons le clivage du support en incubant la CPG durant 1 h et non 20 min, pour être certain qu'il soit complet (Figure 75).

Pour la deuxième déprotection, celle des positions 2'-OH, il est préconisé d'incuber l'oligonucléotide ARN dans une solution de trifluorure de triéthylamine/diméthylsulfoxyde anhydre (TEA.3HF/DMSO) à 65°C pendant 2,5 h pour cliver les groupements silylés (Figure 75). Cette méthode n'est cependant pas applicable à nos conjugués ARN-oligospermines. En effet, nous avons constaté que lorsque nos conjugués cationiques sont mis en présence de la solution de déprotection TEA.3HF/DMSO, il se forme instantanément un précipité qui ne disparaît pas même en chauffant pendant 2,5 h à 65°C. Pour tenter de résoudre ce problème, nous avons essayé de substituer le DMSO par d'autres solvants mais sans résultat positif.

Pour résoudre ce problème de précipitation, nous avons changé de solution de déprotection et utilisé une solution de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) dans du tétrahydrofurane (THF) qui est habituellement utilisée pour le clivage des groupements TBDMS. Pour cette seconde déprotection, nous incubons les conjugués ARN-oligospermine pendant 18 h à température ambiante dans une solution de TBAF 1 M dans du THF. Les conjugués sont totalement solubles et les analyses en spectrométrie de masse Maldi-ToF réalisées montrent que les deux déprotections sont complètes.

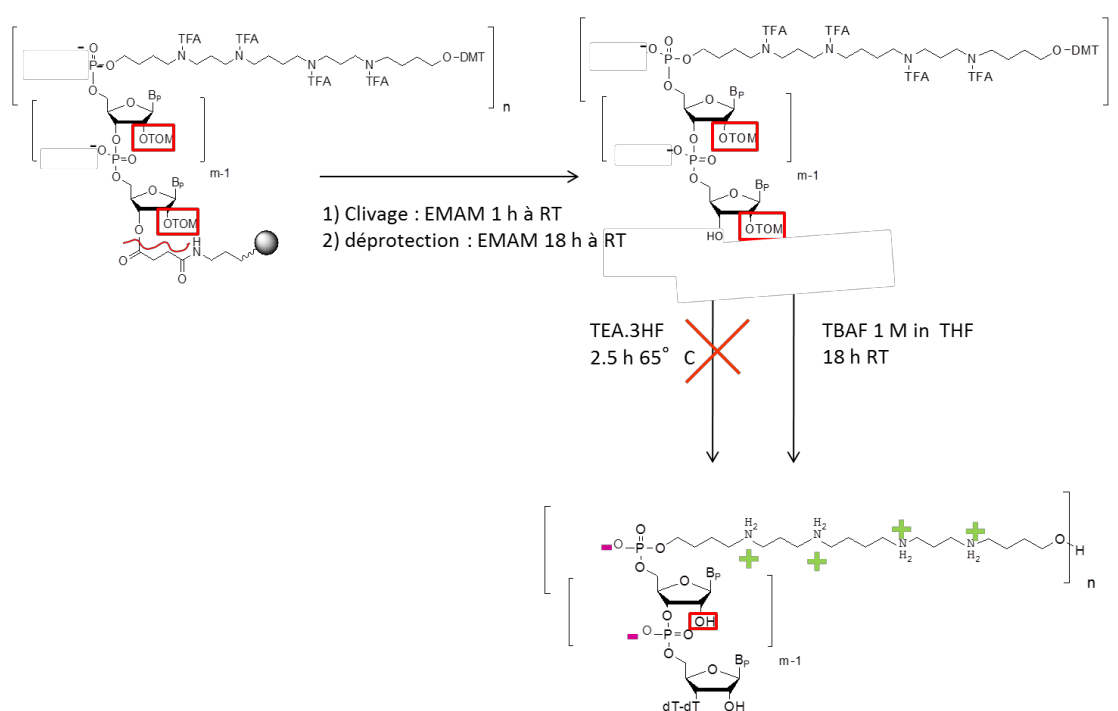


Figure 75 : Déprotection des conjugués ARN-oligospermine.

4. *Stabilité des unités de spermine des conjugués dans les conditions de déprotection.*

- a) Stabilité des unités de spermine lors de la déprotection de nucléobases.

Après avoir résolu le problème de solubilité des conjugués ARN-oligospermine lors de la déprotection des positions 2'-OH, nous avons voulu nous assurer que lors de la première déprotection, celle des nucléobases qui s'effectue dans des conditions basiques, nos conjugués cationiques ne se dégradent pas. Pour cette étude de stabilité nous avons travaillé à partir de l'oligonucléotide modèle Z₈T₁₀ dont la partie ADN est stable dans des conditions basiques.

Pour ces essais, l'oligonucléotide modèle Z₈T₁₀ a été synthétisé avec le synthon phosphoramidite spermine C₄ car étant plus sensible il nous permet une réelle évaluation de la stabilité des unités de spermine en milieu basique.

Pour réaliser ce test de stabilité dans les conditions de déprotection des nucléobases ARNs, nous avons incubé l'oligonucléotide modèle dans une solution d'EMAM pendant 24 h à température ambiante. La condition contrôle de notre test de stabilité est l'incubation de l'oligonucléotide modèle Z₈T₁₀ dans de l'ammoniaque concentré à 65°C pendant 1 h. En effet, nous savons que dans ces conditions l'oligonucléotide est très peu dégradé.

Si l'on compare donc les chromatogrammes du Z₈T₁₀ incubé 24 h dans l'EMAM et celui du Z₈T₁₀ incubé 1 h à 65°C dans l'ammoniaque concentré, on remarque que l'incubation dans l'EMAM ne provoque pas de dégradation (Figure 76). Les pics avec des temps de rétentions supérieurs au pic majoritaire correspondent à des avortons de synthèse. En effet, les chromatogrammes des incubations à 1 h (temps nécessaire au clivage de la CPG) et 24 h sont similaires, ils n'évoluent pas dans le temps. Les unités de spermine des conjugués cationiques sont donc stables dans les conditions basiques de déprotection des nucléobases.

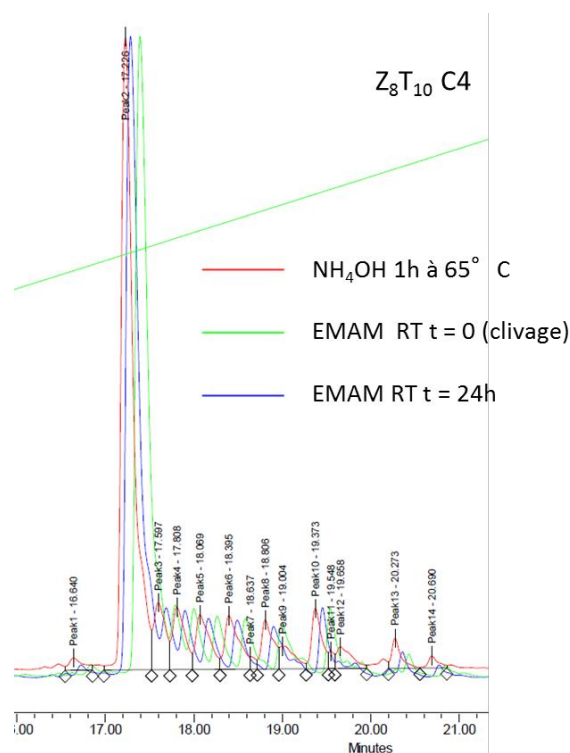


Figure 76 : Stabilité des unités de spermine dans les conditions de déprotection des nucléobases des brins sens cationiques. Les chromatogrammes après incubation dans l'EMAM jusqu'à 24 h sont similaires à celui de la condition de déprotection dans NH_4OH (condition contrôlée) montrant que le domaine oligospermine est stable en résistant aux conditions de déprotection des nucléobases.

b) Stabilité des unités de spermine lors de la déprotection des positions 2'-OH.

Après avoir montré la stabilité du domaine oligospermine dans les conditions basiques de déprotection des nucléobases, nous avons montré leur stabilité dans les conditions de déprotection des positions 2'-OH. Dans le paragraphe précédent nous avons vu que nos conjugués cationiques précipitent dans la solution de déprotection TEA.3HF/DMSO et donc que nous avons utilisé une solution de TBAF. Néanmoins nous avons évalué la stabilité du domaine oligospermine à la fois dans la solution de TEA.3HF/DMSO et dans la solution de TBAF.

Stabilité dans TEA.3HF.

Pour cette étude, nous avons utilisé le même oligonucléotide modèle que dans le paragraphe précédent. Cet oligonucléotide Z_8T_{10} a été incubé jusqu'à 8 h à 65°C dans une solution de TEA.3HF/DMSO alors que seulement 2,5 h sont nécessaires pour cliver les groupements TOM qui protègent les positions 2'-OH (Figure 77). La condition contrôlée est l'incubation du Z_8T_{10} dans NH_4OH concentré pendant 1 h à 65°C. Les chromatogrammes des temps 3,5 h et 8 h d'incubation du Z_8T_{10} dans TEA.3HF/DMSO sont certes moins bien résolus que celui de la condition contrôlée, mais ils montrent clairement que même après plus de 8 h d'incubation à 65°C les unités de spermine ne se dégradent pas.

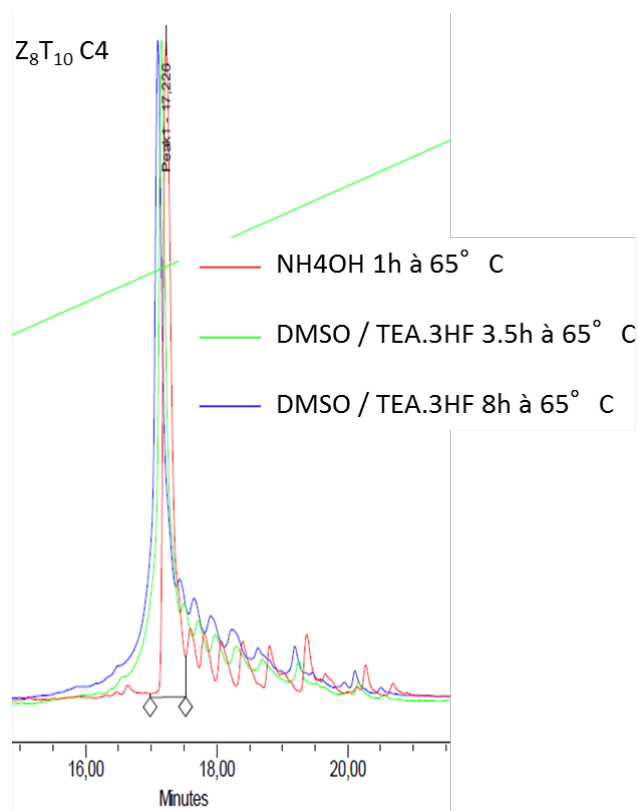


Figure 77 : Stabilité des unités spermines dans les conditions de déprotection TEA.3HF des positions 2'-OH. Les chromatogrammes après incubation dans le mélange DMSO/TEA.3HF jusqu'à 8 h sont similaires à celui de la condition de déprotection dans NH_4OH (condition contrôle) montrant que le domaine oligospermine est stable en résistant aux conditions de déprotection des groupements TOM en position 2'-OH.

Stabilité dans le TBAF.

Nous avons montré que les unités de spermine conjuguées à un oligonucléotide sont stables dans une solution de TEA.3HF, mais nous avons dû arrêter l'utilisation de cette solution car les conjugués cationiques avec au moins 30 unités de spermine n'étaient plus solubles dans cette dernière. Pour pallier ces problèmes de solubilité nous avons utilisé une solution de TBAF pour déprotéger les positions 2'-OH et conserver les conjugués solubles.

Pour évaluer la stabilité des unités de spermine de nos conjugués dans la solution de TBAF, nous avons utilisé le même oligonucléotide Z_8T_{10} que précédemment. Nous l'avons incubé dans une solution de TBAF 1 M dans du THF pendant une nuit à température ambiante. En comparant le chromatogramme du Z_8T_{10} juste après sa mise en solution à $t=0$ avec le chromatogramme du Z_8T_{10} après 18 h d'incubation, on ne constate aucune dégradation (aucun changement du chromatogramme) (Figure 78).

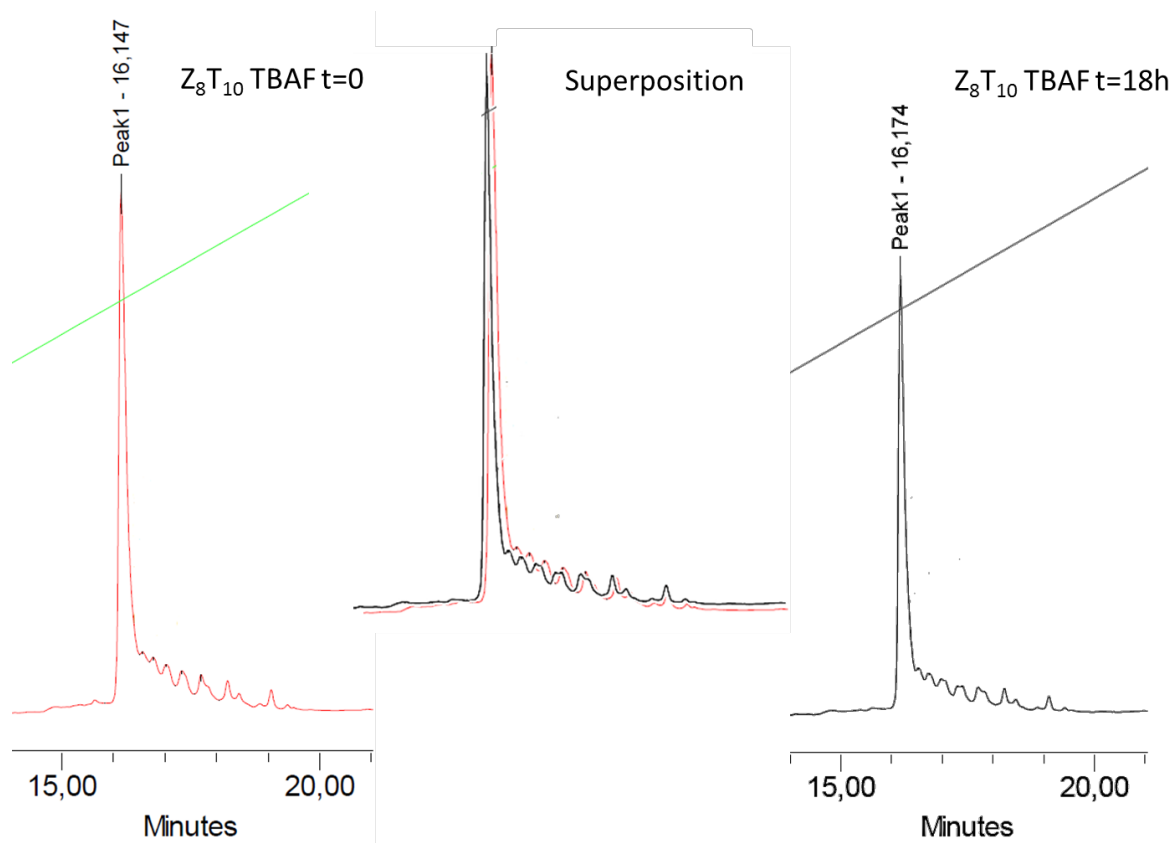


Figure 78 : Stabilité des unités spermines dans les conditions de déprotection TBAF des positions 2'-OH. La superposition montre que les chromatogrammes dans le TBAF à t=0 et après 18 h d'incubation sont similaires montrant que le domaine oligospermine est stable en résistant aux conditions de déprotection des groupements TOM en position 2'-OH.

Le domaine oligospermines de nos conjugués cationiques étaient donc résistant à la fois aux conditions de déprotection des nucléobases et des positions 2'-OH. Après leur dernière déprotection les conjugués cationiques sont en solution dans une solution de TBAF à 1 M dans du THF. Leur purification HPLC n'étant pas possible dans ces conditions au risque d'endommager la colonne, il a fallu éliminer le TBAF/THF pour pouvoir reprendre nos conjugués dans une solution aqueuse compatible avec leur purification HPLC. Une précipitation sélective des conjugués cationiques a été mise au point par le Docteur Gaëlle Deglane, ce qui a permis d'éliminer cette solution de déprotection TBAF/THF.

En effet, elle a mis au point un protocole à base de NaCl et butanol qui ne conduit pas à une précipitation totale de nos conjugués mais à une précipitation partielle. Les quantités de NaCl et de butanol utilisées pour la précipitation sont inférieures aux quantités habituellement utilisées pour les oligonucléotides.

Après avoir précipité les conjugués avec des quantités de sel réduites et après centrifugation, les conjugués cationiques se retrouvent dans le culot (Figure 79 A). Après l'élimination du surnageant (contenant le TBAF/THF), le culot a été repris dans l'eau, mais la solution obtenue était trouble. Une seconde centrifugation a été effectuée, formant un nouveau culot et un nouveau surnageant. Après avoir séparé le surnageant et redissous le culot avec une solution aqueuse de NH_4OH à 0,1 M, des analyses HPLC de chacune des solutions finales ont été effectuées (Figure 79 B). Les chromatogrammes montrent qu'après la

deuxième centrifugation, la majorité de nos conjugués bruts se trouve dans le surnageant et que la majorité des impuretés se trouve dans le culot résiduel repris dans NH_4OH . Les impuretés se composent majoritairement d'avortons de synthèse de la partie oligonucléotide ARN et de la partie oligospermine.

Cette précipitation sélective nous permet de séparer les conjugués cationiques d'une grande partie de leurs impuretés, cependant cette séparation s'accompagne d'une légère perte en rendement des conjugués souhaités. Après cette précipitation, les conjugués ARN-oligospermine cationiques sont prêts à être purifiés par HPLC.

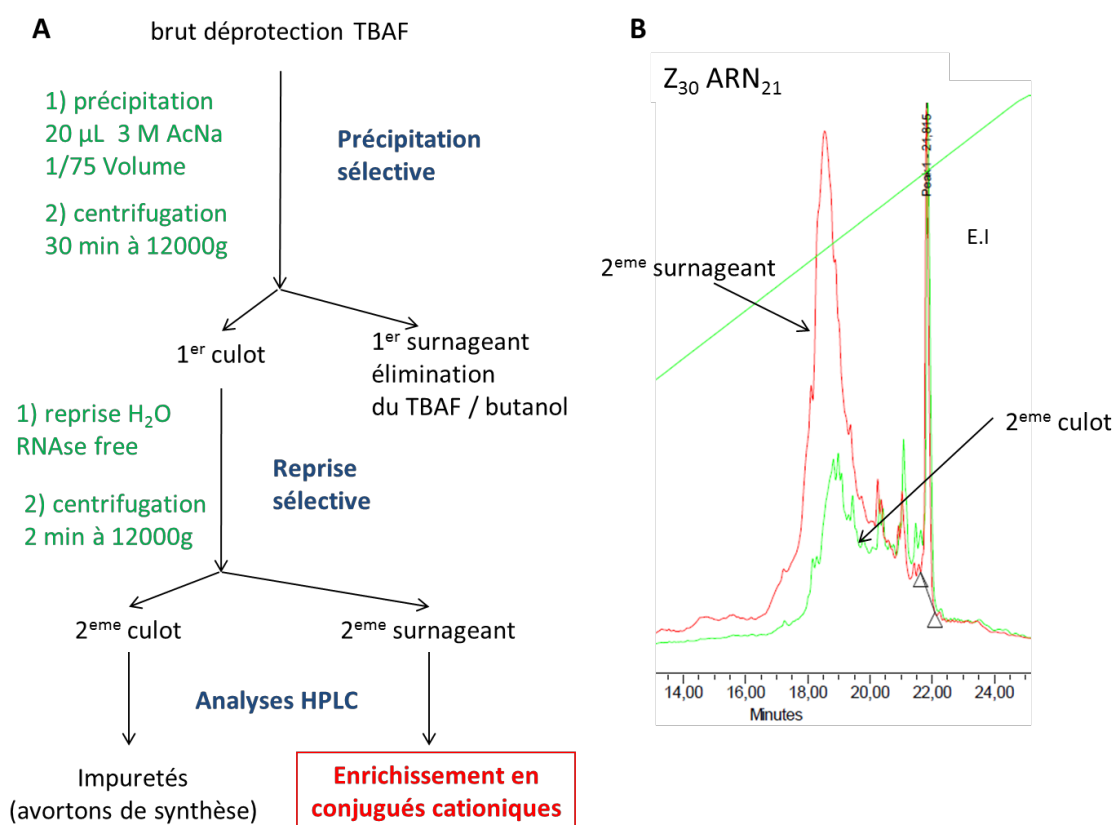


Figure 79 : Précipitation sélective des conjugués ARN-oligospermine cationiques. **A :** étapes de la précipitation sélective. **B :** Analyse du culot et du surnageant après la deuxième centrifugation et reprise dans l'eau et remise en solution du culot dans NH_4OH .

1. Purification des brins sens cationiques.

Purification.

Diverses méthodes sont utilisées en routine pour purifier les oligonucléotides ADNs ou ARNs, mais la plupart d'entre elles ne sont pas applicables à nos conjugués cationiques (Figure 80).

Une des méthodes les plus utilisées pour purifier les oligonucléotides est la purification sur phase inverse à travers des cartouches de C_{18} . C'est cette méthode que nous utilisons pour purifier les ZNAs, cependant cette méthode n'est pas applicable aux conjugués SIRNAPLUS

car ces derniers ne sont pas retenus sur la colonne. En effet comme je l'ai expliqué dans le chapitre concernant les ZNAs, les cartouches de purification permettent de retenir les groupements diméthoxytrityles (DMTs) portés par le dernier nucléotide ou la dernière unité de spermine. Cette rétention basée sur l'interaction entre le groupement hydrophobe DMT et la phase inverse devient difficile lorsque l'oligonucléotide est long puisque le groupement DMT seul ne peut retenir tout l'oligonucléotide. C'est le cas pour nos conjugués ARN-oligospermine qui ne peuvent donc pas être purifiés sur cartouches de phase inverse.

Une autre méthode très largement utilisée pour la production d'oligonucléotides est la purification sur gel d'électrophorèse. Cette méthode permet de séparer les oligonucléotides selon leur charge. Cependant nos brins sens cationiques sont des zwitterions, ils sont à la fois chargés positivement et négativement ce qui ne permet pas leur migration sur gel, ils restent dans les poches où ils sont déposés. Seules des conditions de gel de protéines utilisant le dodécylsulfate de sodium (SDS) permettent leur migration, mais nous ne pouvons employer ce type de gel pour purifier nos conjugués cationiques car il est très compliqué de séparer ensuite l'oligonucléotide du SDS. Nous ne pouvons donc pas utiliser la purification sur gel d'électrophorèse pour purifier nos conjugués cationiques.

La purification des oligonucléotides sur des colonnes HPLC de phase inverse est également très largement utilisée, mais les quelques essais effectués avec nos conjugués utilisant ce type de colonne ont montrés que seulement les oligonucléotides portant 2 unités spermines au maximum peuvent être élués, les autres restent sur la colonne. Cette méthode de purification n'est donc également pas applicable à nos conjugués cationiques.

La méthode qui finalement nous permet de purifier nos conjugués est la purification sur colonne HPLC échangeuse d'anions (IEX-HPLC). Comme je l'ai décrit dans le chapitre 4, la séparation de ces colonnes est basée sur l'interaction entre les charges positives de la colonne et les charges négatives des brins sens cationiques. Donc si on suit la théorie, plus le conjugué cationique est long plus il porte de charges négatives et plus il est retenu sur la colonne. Cependant, en pratique, l'addition d'unités cationiques spermines fait diminuer la rétention des conjugués sur la colonne et entraîne une perte de résolution. Néanmoins d'autres modes de séparation HPLC ont été évalués (colonne échangeuse de cations, phase inverse C_4), mais c'est cette méthode de purification sur colonne échangeuse d'anions qui a donné les meilleurs résultats pour l'instant.

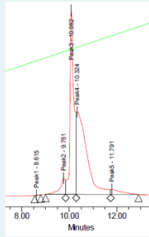
Méthodes	Mode de séparations	Conjugués phosphospermines
DMT-on : cartouche C18	Seuls les composés totalement élongués sont retenus.	 <ul style="list-style-type: none"> - Z_n-ARN très peu retenus: faible quantité finale. - Pureté faible.
PAGE	Selon la charge et la taille.	Pas de migration dans les conditions de gels standard pour les oligonucléotides: utilisation de conditions de gels de protéines.
RP-HPLC	Idem DMT-on ; pureté meilleure.	Pas d'élution si plus de 2 unités phosphospermines.
IEX - HPLC	Selon la charge.	Méthode de purification utilisée.

Figure 80 : Méthodes de purification des oligonucléotides.

Nous utilisons donc une colonne HPLC échangeuse d'anions pour séparer nos conjugués ARN-oligospermine de leurs impuretés, malgré le fait que que cette méthode soit faiblement résolutive. En effet les analyses HPLC de deux fractions, l'une pure (chromatogramme noir [Figure 81](#)), et l'autre impure (chromatogramme rose [Figure 81](#)) montrent deux pics bien résolus avec des temps de rétention très proches. Cependant les seules analyses HPLC ne nous permettent pas de distinguer lequel des deux pics est le produit pur attendu. En effet, il faut analyser ces deux fractions sur gel de type SDS-PAGE (condition d'analyses des protéines) pour pouvoir distinguer laquelle est la fraction pure. En revanche dans le cas d'un échantillon brut contenant des conjugués avec beaucoup d'avortons de synthèse (chromatogramme orange [Figure 81](#)), l'analyse HPLC permet de montrer que l'échantillon est impur et l'analyse sur gel le confirme. Nous utilisons donc une colonne HPLC échangeuse d'anions pour purifier nos conjugués ARN-oligospermines mais l'analyse finale permettant d'évaluer la pureté se fait par gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE.

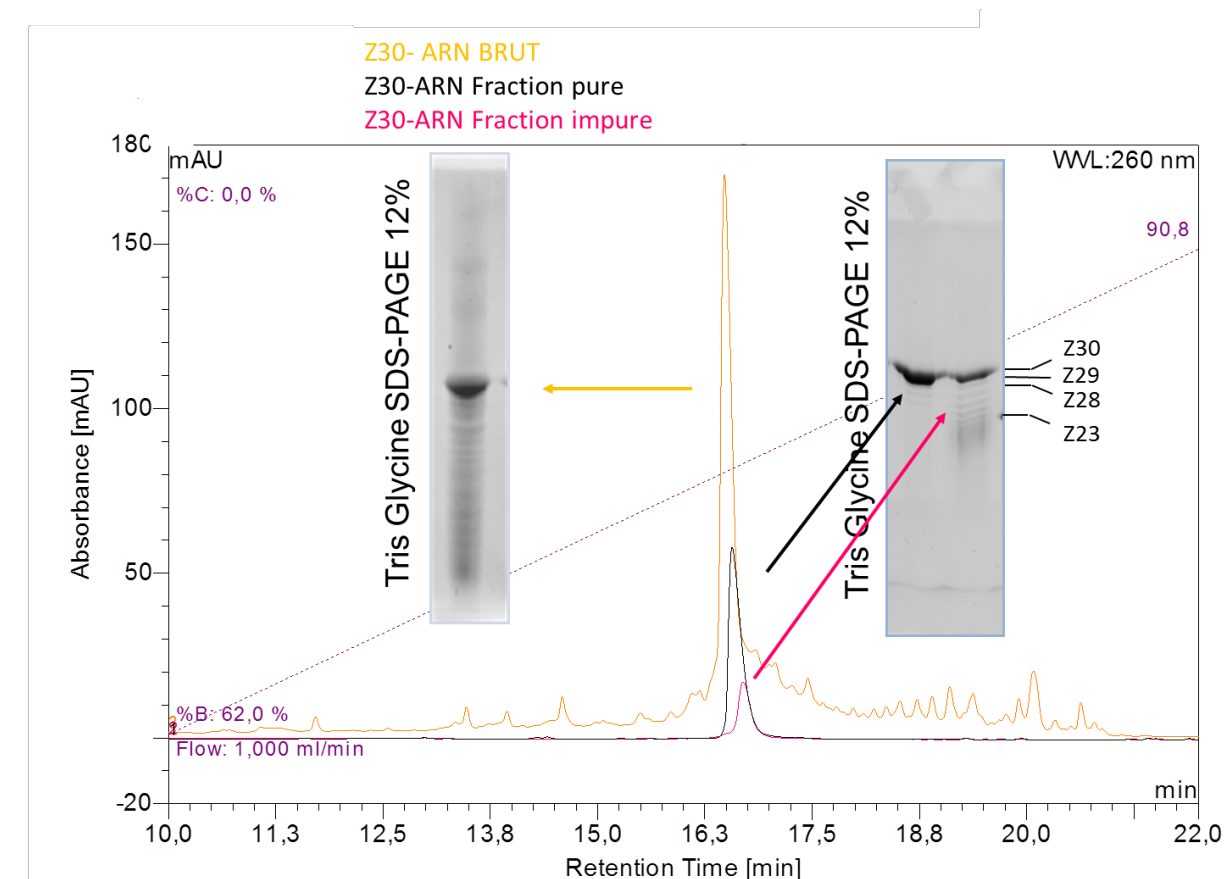


Figure 81 : Purification en IEX-HPLC de conjugués ARN-oligospermine (exemple après 30 couplages de phosphospermine). Conditions : Dionex DNA Pac PA 100 (250 x 9 mm) ; Tampon A : 0,1 M NH_4OH , 10% ACN ; Tampon B : 0,1 M NH_4OH , 10% ACN, 1 M NaCl ; gradient 0-100% Tampon B en 23 min ; débit 2,5mL/min ; température 35°C.

Dessalage des conjugués ARN-oligospermine.

Après avoir été injectés sur la colonne échangeuse d'anions, les conjugués ARN-oligospermine sont séparés en fractions plus ou moins pures. Après analyse sur gel SDS-PAGE, les fractions pures sont rassemblées avant d'être dessalées (car elles contiennent environ 0,5 M de NaCl). Pour le dessalage de nos conjugués, nous utilisons des colonnes commerciales de gel filtration de type Sephadex (GE healthcare ; illustra Nap25) et nous utilisons de l'eau « RNase free » comme éluant. Ce type de dessalage nous permet d'obtenir les brins sans cationiques à des concentrations en chlorure de sodium qui sont compatibles avec leur utilisation *in vitro* et *in vivo*.

2. Caractérisation des conjugués ARN-oligospermine par spectrométrie de masse Maldi-Tof.

L'analyse finale sur gel d'électrophorèse permet d'évaluer la qualité de nos conjugués ARN-oligospermine cationiques, en revanche elle ne permet pas de définir si les conjugués obtenus sont bien les conjugués totalement élongués. En effet, l'analyse sur gel SDS-PAGE nous indique la présence ou non d'impuretés mais ne nous renseigne que très approximativement sur longueur du conjugué. Pour connaître leur masse moléculaire exacte

nos conjugués cationiques doivent être analysés en spectrométrie de masse. Dans le chapitre 4, nous avons vu qu'il était possible d'analyser des conjugués oligonucléotide-oligospermine portant quelques unités de spermine par spectrométrie de masse « electrospray ionisation – time of flight » (ESI-TOF). En effet, ces conjugués avec peu d'unités de spermines sont facilement ionisables, mais lorsque nous avons essayé d'analyser les conjugués portant 25-30 unités spermines par ESI-TOF, nous n'avons obtenu aucun résultat positif. Nous pensons que nos conjugués sont très difficiles à ioniser et que l'ionisation par électro-spray n'est pas adaptée.

Nous nous sommes donc tournés vers une autre technique de spectrométrie de masse : le MALDI-TOF (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight »). Pour ioniser l'échantillon à analyser, cette technique utilise une espèce chimique appelée matrice qui, une fois co-cristallisée avec l'échantillon à analyser, va absorber l'énergie du laser pour la transférer à l'échantillon qui peut être ainsi ionisé.

Le problème majeur de nos échantillons est leur teneur en chlorure de sodium qui forme de nombreux adduits sodium (Na^+) en spectrométrie de masse. En effet, lors de l'étape de purification nous utilisons le chlorure de sodium pour éluer les conjugués cationiques de la colonne échangeuse d'anions, puis nous éliminons en grande partie celui-ci lors du dessalage par gel filtration sans néanmoins parvenir à obtenir des teneurs en sel compatibles pour l'analyse en spectrométrie de masse. Pour prévenir la formation d'adduits sodium nous avons mélangé du citrate d'ammonium avec nos matrices.

Nous avons donc essayé de cristalliser nos conjugués dans des matrices dédiées aux oligonucléotides en présence de citrate d'ammonium telles que l'acide anthranilique, la trihydroxyacétophénone (THAP), l'acide nicotinique, le salicilamide ou encore l'acide 3-hydroxypicolinique (HPA). Les premières analyses de nos conjugués cationiques par MALDI-TOF n'ont pas été très concluantes, les spectres obtenus n'étaient pas résolus ([Figure 82](#)). Pour la plupart des premiers essais, aucun signal n'apparaissait sur les spectres de masse sauf pour les échantillons cristallisés avec la matrice d'acide 3-hydroxypicolinique/citrate d'ammonium dont les spectres montraient un léger début de pic ([Figure 82 A](#)). Nous avons donc choisi de travailler principalement avec cette matrice en essayant de faire varier le rapport volume d'échantillon/volume de matrice pour essayer d'obtenir des spectres avec une meilleure intensité de signal, mais nous n'avons pas obtenu de meilleur signal.

Lors d'une série d'essais nous avons omis d'ajouter le citrate d'ammonium lors de la préparation de la matrice et contre toute attente, l'intensité du signal obtenu était très importante, le signal sortait enfin du bruit de fond. Pour les premières analyses, la concentration de nos conjugués était fixée à 100 μM , en baissant cette concentration à 20 μM nous nous sommes aperçus que les spectres présentaient des pics plus intenses et mieux résolus. Avec ces dernières conditions, l'écart entre la masse moléculaire attendue et la masse moléculaire obtenue pour nos conjugués ARN-oligospermine est de 20 à 100 Da (Dalton), si on considère leur masse importante de 18 000 - 19 000 Da, cela donne une précision de mesure de 0,1 à 0,5% ([Figure 82 B](#)). Cette précision nous permet d'être résolutif à une spermine près (408,5 Da) par contre ne permet pas d'être résolutif pour un adduit comme le cyanoéthyle (53 Da).

Par la suite nous avons essayé de modifier encore les conditions d'analyse sans obtenir de meilleurs résultats sur la résolution et l'intensité du signal.

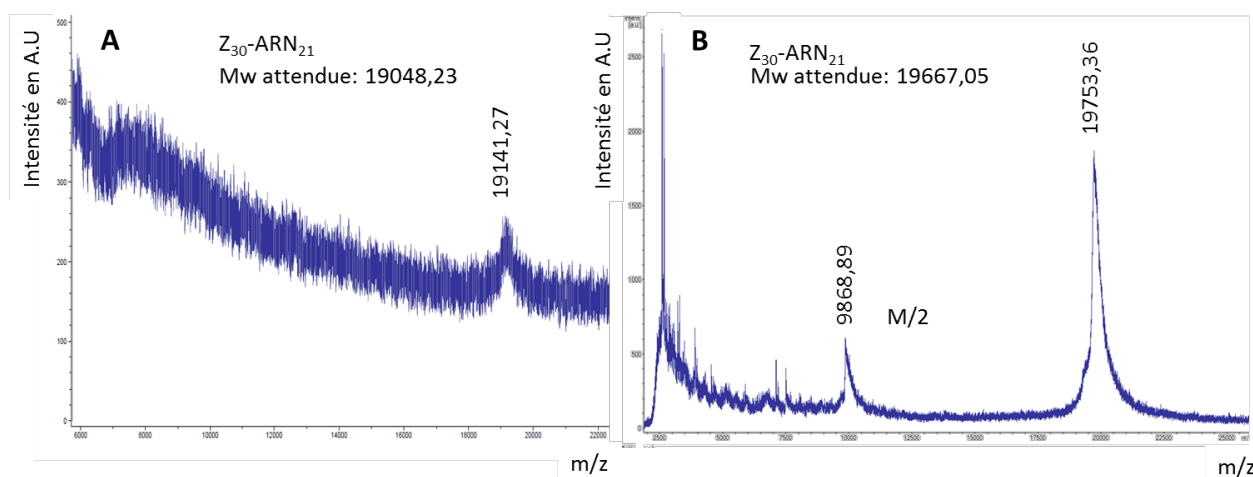


Figure 82 : Analyse des conjugués ARN-oligospermine par spectrométrie de masse MALDI-TOF. A) matrice d'acide 3-hydroxypicolinique/citrate d'ammonium, B) matrice d'acide 3-hydroxypicolinique.

3. Formation des duplexes SIRNAPLUS.

Après purification et caractérisation du brin sens cationique, la formation du duplexe SIRNAPLUS est réalisée. Pour cela, le brin antisens portant l'activité biologique et le brin sens cationique sont incubés pendant 30 min à température ambiante dans de l'eau « RNase free » en quantités équimolaires. La formation des duplexes est ensuite contrôlée par électrophorèse SDS-PAGE avec un gradient de 10-20% Tris-tricine (Figure 83). Après révélation des bandes au bromure d'éthidium, on remarque que les bandes correspondantes aux brins sens et antisens seuls disparaissent et qu'il apparaît alors une nouvelle bande indiquant la formation du duplexe. La bande formée montre que la migration du duplexe est plus faible que celle du simple brin sens cationique ce qui prouve également la formation du duplexe.

Des essais de duplexation du brin sens cationiques avec un brin antisens non complémentaire ont également été réalisés. Les gels montrent deux bandes distinctes, ce qui signifie que l'hybridation n'est pas possible si les deux brins ne sont pas complémentaires même en présence des unités cationiques spermines : elle est spécifique.

Après avoir été formés les duplexes SIRNAPLUS sont prêts à être utilisés pour évaluer leur activité biologique. Ils sont censés induire l'extinction d'un gène cible par la voie de l'ARN interférence. Lors de cette thèse, mon travail a porté sur la synthèse et la caractérisation des brins sens cationiques et des duplexes SIRNAPLUS.

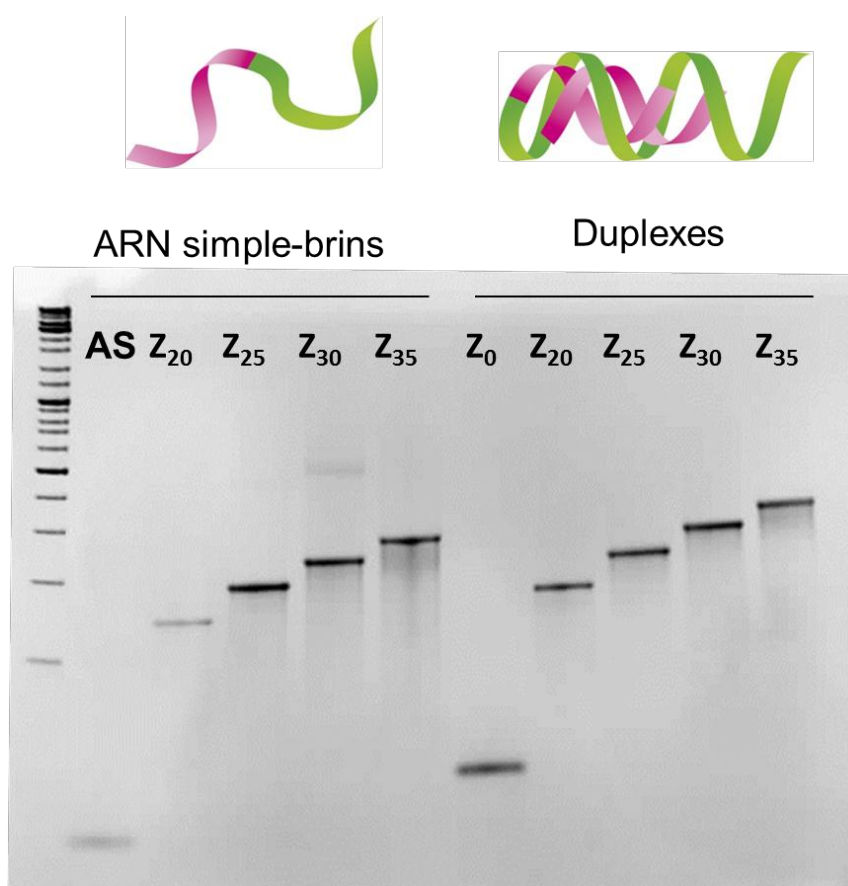


Figure 83 : Caractérisation sur gel d'électrophorèse de la formation des duplexes de SIRNAPLUS. AS= brin antisens. Z_{20} - Z_{35} = nombre d'unités de spermine portées soit par le brin sens ou soit par le duplexe.

C. ARTICLE : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES SIRNAPLUS *IN VITRO*.

L'article qui suit décrit la synthèse et la formation des duplexes SIRNAPLUS ainsi que les tests effectués pour évaluer leur activité biologique *in vitro*. Mon travail pour cet article a porté sur la synthèse et la formation des SIRNAPLUS, les tests *in vitro* ont été réalisés par mes collègues biologistes Valérie Moreau et le Docteur Nathalie Lenne.

Une fois introduits dans les cellules, les siRNAs permettent l'extinction d'un gène cible par la voie de l'ARN interférence. Ce processus d'extinction catalytique d'un gène est efficace et simple à mettre en œuvre car il est seulement basé sur la complémentarité entre le brin antisens du siRNA et l'ARN messenger cible. Cependant la difficulté majeure reste le passage des nombreuses barrières biologiques pour localiser le siRNA dans le cytoplasme des cellules et celles qui limitent la diffusion des siRNAs jusqu'aux tissus cibles dans un contexte *in vivo*.

Comme je l'ai expliqué précédemment, les siRNAs seuls ne peuvent pas pénétrer dans les cellules animales. En effet, ils ont besoin d'être vectorisés pour pouvoir être endocytés par les cellules et être ensuite libérés dans le cytoplasme où ils vont pouvoir induire le mécanisme d'ARN interférence. En général les siRNAs sont vectorisés par le biais de polymères ou de lipides cationiques qui s'avèrent être très efficaces pour la transfection *in vitro*. Les formulations à base de lipides ou de polymères cationiques ont l'inconvénient de

former des particules qui ont une biodistribution limitée, de plus leur élimination de l'organisme est rapide.

Pour la stratégie antisens, il a été montré que des ligands directement conjugués sur des oligonucléotides permettaient d'améliorer leur biodistribution et leur pénétration cellulaire. En effet, les molécules ainsi formées étaient plus petites que des particules permettant ainsi une meilleure diffusion dans les tissus.


C'est à partir de ce principe qu'ont été synthétisés les SIRNAPLUS possédant une charge globale positive. Le fait de contrôler leur synthèse nous permet de dire qu'en solution les SIRNAPLUS seront à l'état moléculaire contrairement aux formulations de siRNA à base de polymères ou lipides cationiques. De plus, cette charge globale positive des SIRNAPLUS leur permet de pénétrer les membranes cellulaires sans agent de transfection.

L'article qui suit décrit brièvement la chimie des conjugués ARN-oligospermine, chimie que je vous ai décrite au début de ce chapitre. L'article présente également les résultats des différentes technologies mises en œuvre pour caractériser à la fois les brins sens conjugués aux spermines et les duplexes SIRNAPLUS. L'enjeu de cet article était aussi de prouver l'activité des SIRNAPLUS en présence de sérum ainsi que le fait que l'activité obtenue est conforme à un mécanisme d'ARN interférence.

1 Conjugating Phosphospermines to siRNAs for Improved Stability in 2 Serum, Intracellular Delivery and RNAi-Mediated Gene Silencing

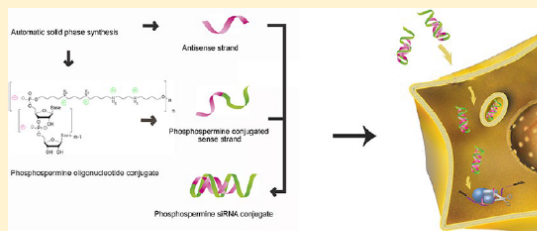
3 Clément Paris,[†] Valérie Moreau,[†] Gaëlle Deglane,[†] Loukmane Karim, Bernard Couturier,
4 Marie-Elise Bonnet, Valérie Kedingler, Mélanie Messmer, Anne-Laure Bolcato-Bellemin, Jean-Paul Behr,
5 Patrick Erbacher, and Nathalie Lenne-Samuel*

6 Polyplus-transfection SA, Bioparc, Boulevard S. Brant, Illkirch, 67401, France

7  Supporting Information

8 **ABSTRACT:** siRNAs are usually formulated with cationic
9 polymers or lipids to form supramolecular particles capable of
10 binding and crossing the negatively charged cell membrane.
11 However, particles hardly diffuse through tissues when
12 administered *in vivo*. We therefore are developing cationic
13 siRNAs, composed of an antisense sequence annealed to an
14 oligophosphospermine-conjugated sense strand. Cationic
15 siRNAs have been previously shown to display gene silencing
16 activity in human cell line (Nothisen et al. *J. Am. Chem. Soc.*
17 **2009**). We have improved the synthesis, purification and
18 characterization of oligospermine-oligoribonucleotide conjugates which provide cationic siRNAs with enhanced biological
19 activity. We show data supporting their carrier-free intracellular delivery in a molecular, soluble state. Additional results on the
20 relationship between global charge, uptake and silencing activity confirm the requirement for an overall positive charge of the
21 conjugated siRNA in order to enter cells. Importantly, conjugated siRNAs made of natural phosphodiester nucleotides are
22 protected from nuclease degradation by the oligophosphospermine moiety, operate through the RNAi mechanism and mediate
23 specific gene silencing at submicromolar concentration in the presence of serum.

24 **KEYWORDS:** oligonucleotide conjugate, siRNA delivery, ZNA, spermine



25 ■ INTRODUCTION

26 Thanks to their unprecedented potency to post-transcription-
27 ally turn off the expression of any target gene in tissue culture,¹
28 small interfering RNAs (siRNAs) have allowed researchers to
29 make inestimable advances in understanding biological
30 processes over the past decade. Mechanistically, synthetic
31 siRNAs, which are 19–23 base-pair duplexes, exploit the
32 cellular RNAi pathway which has the function to naturally
33 regulate gene expression. In plants and invertebrates, it is also a
34 mechanism of defense against pathogens.² siRNAs are loaded
35 by the cellular RISC complex, which triggers duplex unwinding
36 and selection of the antisense (guide) strand while the sense
37 (passenger) strand is discarded. Within RISC, the antisense
38 strand mediates gene silencing by guiding the enzymatic
39 machinery to the target mRNA, which is specifically cleaved
40 between positions 10 and 11 opposite to the siRNA antisense
41 strand.^{3,4} siRNA-induced gene silencing takes place in the
42 cytoplasm, although evidence for RNAi activity in the nucleus
43 has also been reported.^{5–7} The process is catalytic, explaining
44 its outstanding efficacy. In addition, it is based on base-pair
45 recognition, making design of siRNAs easy in theory. siRNAs
46 have thus soon offered great therapeutical promises, but their
47 efficient delivery *in vivo* into target cells and tissues is still a
48 largely unsolved issue.

49 Nucleic acids and siRNAs in particular do not penetrate
50 animal cells efficiently. To be delivered into the cytosol and
51 elicit RNAi, siRNAs do need assistance to be first internalized
52 by endocytosis and then to be released from the endosomal
53 vesicles. *In vivo*, additional injection route-dependent difficulties
54 arise, such as endothelial wall extravasation, rapid clearance or
55 diffusion throughout tissues.⁸

56 Vector-based delivery systems, and predominantly complex-
57 ation with cationic lipids or polymers, provide efficient means
58 to deliver siRNAs into the cell cytoplasm in culture. Many such
59 formulations have also demonstrated some activity in
60 animals,^{9,10} and several lipid nanoparticles are under clinical
61 investigation.¹¹ However, being particles, they generally exhibit
62 limited biodistribution as a consequence of their size.

63 Direct ligand conjugation to oligonucleotides has been
64 proposed early as an alternative to achieve targeting and
65 intracellular delivery.¹² Being much smaller in size than
66 nanoparticles, conjugated siRNAs are expected to exhibit
67 enhanced tissue diffusion. Many molecules have been used as
68 ligands following various conjugation strategies.¹³ Cholesterol–

Received: May 18, 2012

Revised: September 7, 2012

Accepted: October 24, 2012

69 siRNAs as well as other lipid conjugates have been shown to
70 display enhanced cell uptake and prolonged circulation
71 lifetimes by interacting with serum lipoproteins or albumin.^{14,15}
72 Other ligands have been conjugated to bind specifically to
73 surface receptors such as integrins.¹⁶ Still other conjugated
74 ligands were cell-penetrating-peptides (CPPs), i.e., short
75 peptides rich in positively charged amino acids which have
76 been used to enhance cell entry. The conjugation of CPPs to
77 siRNAs has provided contradictory reports, most likely due to
78 contamination by excess free CPP molecules which behave as
79 vectors.^{17,18} However, genuine CPP-siRNA conjugates display
80 an overall negative charge and hence enter poorly into cells.¹⁹

81 We reported earlier that conjugation of cationic oligophos-
82 phospermine to anionic oligonucleotides enhanced their
83 hybridization properties, hence their name ZNA for zip nucleic
84 acids.^{20–22} When their net charge is positive, conjugates enter
85 animal cells in culture without carrier.²³ Corey and
86 collaborators also reported carrier-free antisense and antigene
87 activity of single-stranded ZNAs.²⁴ By annealing a conjugated
88 sense strand to a nonconjugated antisense sequence, we made
89 cationic siRNAs and reported the first evidence of induced gene
90 silencing in animal cells.²⁵ We meanwhile improved the
91 stepwise synthesis and purification of oligophosphospermine-
92 oligoribonucleotide conjugates which allowed full end charac-
93 terization of cationic siRNAs. Here we provide further
94 description and a complete study on the activity and the
95 mechanism of action of cationic siRNAs.

96 ■ EXPERIMENTAL SECTION

97 **siRNA Sequences.** All the oligonucleotides were from
98 Eurogentec (Seraing, Belgium). Sense strands were either fully
99 processed by the oligonucleotide supplier or deprotected and
100 purified following the method described below for oligophos-
101 phospermine conjugates. Antisense sequences (AS) contained a
102 phosphorothioate linkage as indicated by *. GL3 sense, 5'-
103 CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3'; ASGL3, 5'-UC-
104 GAAGUACUCAGCGUAAGdT*dT-3'; GL2 sense, 5'-
105 CGUACGCGAAUACUUCGAdTdT-3'; ASGL2, 5'-UC-
106 GAAGUAUCCGCGUACGdT*dT-3'; Survivin sense, 5'-
107 CCGCAGUGAAUUCUUGAAAdTdT-3'; ASSurvivin, 5'-UU-
108 CAAGAAUUCACUGACGGdT*dT-3'.

109 **Oligophosphospermine Conjugated Oligoribonucleo-
110 tide Synthesis.** Oligophosphospermine conjugation was
111 carried out on a K&A synthesizer H8-SE (www.ka-lab.de),
112 using DMT-ON TOM protected oligoribonucleotides provided
113 on CPG solid support by Eurogentec. Oligonucleotide
114 synthesis reagents were from Glen Research. DMT-spermine
115 phosphoramidite was synthesized according to the published
116 procedure.²⁵ A prolonged coupling time (6 min) was used for
117 phosphospermine coupling. Coupling yields were evaluated by
118 measuring the absorbance at 504 nm of selected recovered
119 DMT fractions diluted in 100 mL of 3% TCA/dichloro-
120 methane solution and were 98% in average. After treatment
121 with 20% diethylamine (DEA) in acetonitrile, DMT-OFF
122 conjugates were successively cleaved (1 h) and deprotected
123 (overnight) with methylamine in ethanol/water (EMAM) at 25
124 °C. After lyophilization, 2' TOM deprotection was carried out
125 in 500 μ L of *tert*-butylammonium fluoride in THF (TBAF)
126 overnight at room temperature, followed by butanol precip-
127 itation.

128 HPLC purifications were carried out using a DIONEX
129 Ultimate 3000, DNAPac-200 column (Dionex), 2.5 mL·min⁻¹;

eluent A, NH₄OH 0.1 M, 10% acetonitrile; eluent B, NH₄OH
0.1 M, NaCl 1 M, 10% acetonitrile.

Fractions containing the full length conjugate were pooled,
desalted in illustraNAP-25 prepacked columns (GE Health-
care), lyophilized, dissolved in RNase-free water and stored at
–20 °C.

MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Bruker
Daltonics Reflex IV. Matrix used for preparing the samples was
saturated with 3-hydroxyisobutyric acid (3-HIBA) in a solution 50%
acetonitrile/0.05% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich). Sam-
ples were diluted with RNase-free water at about 20 μ M, mixed
with matrix at sample to matrix ratio of 1:1. MALDI spectra
were obtained in positive mode. The parameters used for the
mass acquisition were as follows: extraction delay time, 200 ns;
laser repetition rate, +19.9 Hz; power of laser, 95%. MALDI
spectra were acquired in 100 shot segments that were
accumulated until background noise had receded to the best
possible level. The mass increase expected per phosphosper-
mine unit is +408 Da.

Characterization by SDS-PAGE and siRNA Formation.
Nonconjugated and cationic siRNAs were formed at 20 μ M in
RNase-free water by mixing an equimolar amount of each sense
and antisense strand. Annealing was performed at room
temperature for 30 min.

Oligophosphospermine conjugated oligoribonucleotides
were analyzed on 12% Tris-glycine SDS-PAGE (stacking gel,
5% acryl-bisacrylamide 19:1/SDS 0.1%; resolving gel, 12%
acryl-bisacrylamide 19:1/SDS 0.1%). Samples were loaded in
loading buffer (glycerol 5%/SDS 0.1% final); migration buffer
was Tris 0.025 M, glycine 0.192 M, SDS 0.1% final.

For duplex analysis, samples were loaded on 10–20%
gradient Tris-Tricine precast gels (Biorad), and electrophoresis
was carried out in Tris-Tricine 10 mM/0.01% SDS pH 8.3
migration buffer (Biorad).

After electrophoresis, gels were incubated in ethidium
bromide (0.5 μ g/mL in H₂O) and imaged upon UV
transillumination using the G:BOX gel imaging system
(Syngene). Quantitative analysis was performed using the
dedicated GeneTools software (Syngene).

Cell Culture. A549 cells (human lung carcinoma) stably
expressing GL3 luciferase (A549Luc cells) were grown in
RPMI medium 1640 (Lonza), supplemented with 10% FBS, 2
mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL
streptomycin, and 0.8 μ g/mL G418. B16-F10 cells (mouse
skin melanoma, ATCC CRL-6475) were grown in Dulbecco's
modified Eagle's medium containing 4.5 g/L glucose (Euro-
bio), supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100
units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin.

A549Luc and B16-F10 cells were maintained at 37 °C in a
5% CO₂ humidified atmosphere.

**Cationic siRNA Incubation and Transfection Experi-
ments.** The day before the experiment, 2.5 \times 10⁴ cells were
seeded in 24-well tissue culture plates in 1 mL of fresh
complete medium containing 10% FBS. Before the incubation
with cationic siRNAs, the medium was either replaced by 0.5
mL of fresh serum-free medium or 0.5 mL of complete
medium. For a triplicate experiment, cationic siRNAs were
diluted in 300 μ L of Opti-MEM (Life Technologies), and the
solutions were vortex-mixed for 10 s and immediately added to
the cells (100 μ L per well). Plates were hand-rotated to ensure
homogeneity and incubated at 37 °C. After 4 h incubation, the
medium was completed to 1 mL of complete medium
containing 10% FBS. The plate was further incubated at 37

193 °C for 24 or 48 h. As transfected controls, standard siRNA
194 lipoplexes were formed using the cationic lipid reagent
195 INTERFERin (Polypplus-transfection SA) as described by the
196 supplier.

197 **Luciferase Activity and Total Protein Assay.** The cells
198 were rinsed with 1 mL of PBS and then were lysed with 100 μ L
199 per well of cell culture lysis buffer 1 \times (Promega) at room
200 temperature for 30 min. The lysates were collected and
201 centrifuged at 15000g for 5 min at 4 °C. Luciferase enzyme
202 activity was quantified with a Centro LB960 luminometer
203 (Berthold) with 2.5 μ L of supernatant lysate and after addition
204 of 50 μ L of luciferin solution (Promega). The protein
205 concentration was measured by the BCA protein assay kit
206 (Pierce). The luciferase activity was expressed as relative light
207 units integrated for 10 s (RLU) per well or RLU per mg of cell
208 protein (RLU/mg). The luciferase silencing efficiency was
209 calculated relative to the luciferase activity of nontreated
210 A549Luc cells.

211 **Cell Uptake Assessment.** Fluorescently labeled standard
212 GL3 siRNA or cationic GL3 siRNAs were obtained by
213 annealing nonconjugated or conjugated sense strand with a
214 3'-Rhodamine GL3 antisense strand (Eurogentec). A549Luc
215 cells were incubated with fluorescent cationic siRNAs or
216 transfected with fluorescent standard siRNA lipoplexes as
217 described above.

218 **Microscopic Observation.** Cells were observed in PBS by
219 fluorescent microscopy (Nikon Eclipse TE2000-S fluorescent
220 microscope coupled to a Nikon digital camera).

221 **Flow Cytometry.** A549Luc cells incubated with fluorescent
222 cationic siRNAs were washed, submitted to trypsin treatment
223 and resuspended in complete medium. The cell suspensions
224 were counted with an automated cell counter (Biorad) to verify
225 the concentration (<500 cells/ μ L). Fluorescent data were
226 gathered using a microcapillary flow cytometer Guava EASY-
227 CYTE 6HT (Guava Technologies, Millipore) equipped with a
228 488 nm diode laser. Rhodamine fluorescence was collected at
229 583 nm. Data were analyzed using GuavaSoft (Millipore).
230 Forward scatter gating was set to exclude dead cells and debris.
231 A minimum of 1000 events were collected to each histogram.
232 Analytical gates were chosen such that <2% of control cells fell
233 within the positive region. The X-mean value expressing the
234 mean intensity of fluorescence per fluorescent cell was plotted
235 as a function of percentage of serum in the cell culture medium.

236 **siRNA Degradation Assays.** 1.5 μ g of conjugated and
237 nonconjugated siRNAs was incubated in 6 μ L of 10% FBS at 37
238 °C for 0, 2 and 4 h. When indicated, 4 U of pancreatic
239 ribonuclease inhibitor RNaseOUT (Life Technologies) was
240 added prior to FBS.²⁶

241 Alternatively, 50 pmol of conjugated and nonconjugated
242 siRNA was incubated in the presence of 0, 1, 10 or 100 ng of
243 RNase A (Qjagen) in 10 μ L of H₂O at 37 °C for 2 h.

244 After incubation, samples were analyzed on Tris-Tricine
245 SDS-PAGE as described above.

246 **Total RNA Extraction for RT-qPCR or 5'RACE Assays.**

247 Total RNA from triplicate experiments was isolated from
248 treated or nontreated A549Luc or B16-F10 cells using RNA
249 NOW reagent (Biogentex) following the manufacturer's
250 instruction. After isopropanol precipitation, RNA was resus-
251 pended in RNase-free water and stored at -80 °C. RNA quality
252 was assessed by agarose gel electrophoresis and A260/280 ratio.

253 **RNAi Specific Cleavage Determination Using 5'RACE**
254 **Assays.** 5'RACE was carried out using the Gene Racer kit
255 (Life Technologies). 1 μ g of extracted RNA was ligated with 25

ng of Gene Racer oligonucleotide in a final reaction containing
T4 RNA ligase (5 U), 1 \times ligase buffer, 1 mM ATP and 40 U of
RNaseOUT and incubated at 37 °C for 1 h. After ethanol
precipitation, ligated RNA was washed and resuspended in
RNase-free water. For cDNA synthesis, 5 μ L of ligated RNA,
500 μ M dNTPs and 200 nM GL3-specific RT primer (5'-
CGTGATGGAATGGAACAAC-3') were incubated in a 10 μ L
volume at 65 °C for 5 min to denature the RNA and then
chilled on ice for at least 1 min. A mix containing 1 \times first strand
buffer, 5 mM dithiothreitol (DTT), 200 U of Superscript III
Reverse transcriptase and 40 U RNaseOUT was added to
RNA/primer mix to a final volume of 20 μ L. The reaction was
performed at 55 °C for 45 min, heat inactivated at 70 °C for 15
min and then chilled on ice. 2 U of RNase H was added in each
tube and then incubated at 37 °C for 20 min.

Subsequent PCR reactions were performed in a final volume
of 20 μ L in iCycler thermocycler (Biorad). The final reaction
mixtures were composed of 2 μ L of the reverse transcription
reaction, 1 U of EconoTaq DNA Polymerase (Lucigen), 1 \times
EconoTaq buffer, 200 μ M dNTP, 3 mM MgCl₂ and 200 nM
concentrations of each of the PCR primers (gene racer 5'
primer, 5'-CGACTGGAGCAGGAGACTGA-3'; GL3 re-
verse primer, 5'-ACGGTAGGCTGCGAAATGCCCAT-3').
Cycling conditions were 10 cycles (94 °C for 20 s, 67 °C for
20 s, 72 °C for 15 s) and 25 cycles (94 °C for 20 s, 64 °C for 20
s, 72 °C for 15 s). PCR reactions were analyzed on 3% Seakem
agarose gel (Lonza).

Quantification of the Survivin mRNA Using RT-qPCR.
cDNA was prepared as follows: 1 μ g of total RNA, 500 μ M
dNTPs, 2.5 μ M oligodT and 100 nM Survivin RT primer (5'-
GCCACAAAACCAAGAGAGG-3') were incubated in a 10
 μ L volume at 65 °C for 5 min to denature the RNA and then
chilled on ice for at least 1 min. Mix containing 1 \times first strand
buffer (Life Technologies), 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂,
SuperScript III RT (200 U) and RNase OUT (40 U) was
added to RNA/primer mix to a final volume of 20 μ L. The
reaction was performed at 50 °C for 50 min, heat inactivated at
85 °C for 5 min and then chilled on ice. Samples were
incubated with RNase H (2 U) at 37 °C for 20 min.

All subsequent qPCR reactions were performed in duplicate
in a final volume of 10 μ L using a Rotor-Gene 6000 instrument
(Corbett Life Science). Reaction mixtures were composed of 5
 μ L of Sensimix NoRef (Quantace), 3 mM MgCl₂, 10 ng to 10
pg of cDNA. Survivin target was amplified using a SYBR Green-
based qPCR assays with a 200 nM concentration of each
primer (Survivin forward, 5'-TCTGGCAGCTGTACCTCAA-
GAACT-3'; Survivin reverse, 5'-AAACTGGGCCAAAT-
CAGGCT-3'). Cycling conditions were 95 °C for 15 s, 63 °C
for 20 s, 72 °C for 15 s. HPRT1 mRNA was used for
normalization and was quantified using a probe-based detection
reaction, with a 600 nM concentration of each primer
(HPRT1F, 5'-TGGTTAAGCAGTACAGCCCCA-3';
HPRT1R, 5'-GGCCTGTATCCAACACTTCGAGA-3') and
300 nM of the ZNA-modified hydrolysis probe (FAM-
CACCAGCAAGCTTGC-Z₄-BHQ₂, Metabion International
AG) (see supplementary table in the Supporting Information
for Survivin and HPRT1 sequence location). Cycling
conditions were 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The
presence of PCR inhibitors in samples has been assessed by
determining the qPCR efficiency (E) for both targets in each
sample using the dilution method. HPRT1 was used as
reference gene since its expression compared in control and
treated samples was shown to be stable (7 samples; cDNA 318

C

dx.doi.org/10.1021/mp300278b1Mol. Pharmaceutics XXXX, XXX, XXX-XXX

319 corresponding to 10 ng of total RNA; mean $C_q = 21.1$; SD =
 320 0.214). The relative expression of the survivin mRNA was
 321 calculated using the $\Delta\Delta C_q$ method following the relation

$$\text{relative survivin mRNA expression} = \frac{(1 + E_{\text{survivin}})^{\Delta C_{q\text{survivin}}(\text{control}-\text{sample})}}{(1 + E_{\text{HPRT1}})^{\Delta C_{q\text{HPRT1}}(\text{control}-\text{sample})}}$$

322 **Survivin Protein Expression Level by Western Blot.**
 323 B16-F10 cells in a 24-well plate were rinsed with 1 mL of ice-
 324 cold PBS and scraped off the dish in 30 μL per well of RIPA
 325 buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM
 326 EDTA, 0.5% Triton, 0.05% SDS and protease inhibitor cocktail
 327 (Sigma-Aldrich). The lysates were incubated on ice for 20 min
 328 and then centrifuged at 15000g for 5 min at 4 °C. 40 μg of total
 329 protein lysate was denatured in Laemmli buffer with β -
 330 mercaptoethanol at 95 °C for 5 min prior to being run on 15%
 331 SDS-PAGE. The gel was transferred on a PVDF membrane
 332 (Millipore). For Survivin protein immunodetection, all the
 333 incubations and washing steps were done in PBS-(tween20
 334 0.1%)-(BSA 5%): blocking for 1 h at room temperature,
 335 incubation with the rabbit anti-survivin polyclonal antibody
 336 (Cell Signaling Technology, #2808 rabbit) diluted in 1/1000
 337 overnight at 4 °C, then incubation at room temperature for 1 h
 338 with a goat peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (AP132P,
 339 Millipore) diluted at 1/10000. For GAPDH detection, all the
 340 incubations and washing steps were performed in PBS-
 341 (tween20 0.1%)-(nonfat dry milk 5%): blocking for 1 h at
 342 room temperature, incubation with a mouse anti-GAPDH
 343 monoclonal antibody (Ambion, Austin, TX) diluted at 1/8000
 344 overnight at 4 °C, then incubation at room temperature for 1 h
 345 with a goat peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (A9917,
 346 Sigma-Aldrich) diluted at 1/20000. Signal revelation was done
 347 using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate
 348 (Pierce) following manufacturer's instructions using darkroom
 349 development techniques. Kodak films were then imaged with
 350 the G:BOX imaging system (Syngene). Survivin and GAPDH
 351 immunoblotting were carried out successively, without
 352 stripping step.

353 ■ RESULTS

354 **Synthesis, Deprotection and Purification of Phospho-**
 355 **spermine-Oligoribonucleotide Conjugates.** In the
 356 present work, we used the standard siRNA design consisting
 357 of two annealed strands of 19 ribonucleotides, each extended
 358 with an overhanging dTdT at its 3' end as described originally
 359 by Tuschl and collaborators¹ (Figure 1). A phosphorothioate
 360 linkage between the 2 dTs was the only modification of the
 361 antisense strand. We focused our initial efforts on the synthesis
 362 of the phosphospermine-conjugated sense strand which is
 363 produced by stepwise conjugation of 20 to 35 phosphosper-
 364 mine units at the 5' end of the oligoribonucleotide following
 365 standard solid state phosphoramidite chemistry.^{22,25} Due to the
 366 iterative nature of the process, the amount of full length
 367 product recovered is primarily conditioned by a good coupling
 368 yield of the phosphospermine at each cycle. We achieved a
 369 coupling yield of 98%, meaning that elongation stopped for 2%
 370 of the molecules at each cycle, resulting in a polydisperse crude
 371 material. Purity therefore depends on the ability to resolve
 372 polydispersity. In our first study, DMT-ON full length products
 373 were simply enriched using reverse phase RP cartridges²³ and a
 374 more efficient purification step was required. Anion exchange

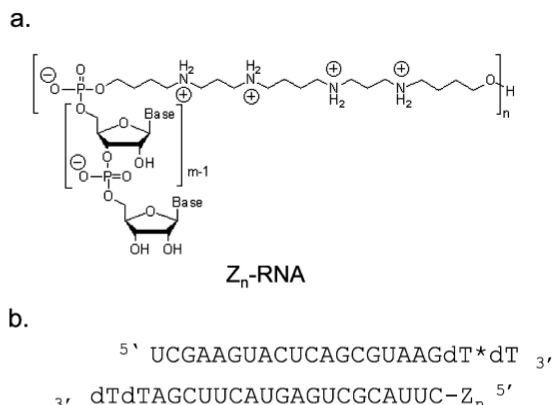


Figure 1. Structure of 5'- conjugated oligoribonucleotide (a) and cationic siRNA containing n phosphospermine units (b). * represents a phosphorothioate linkage.

IEX-HPLC purification had been successfully developed for
 oligodeoxyribonucleotides containing few phosphospermines.²⁵
 It was conducted under highly basic conditions in order to
 deprotonate spermine residues. Surprisingly such basic
 conditions did not induce RNA hydrolysis, and we therefore
 applied this purification method to our deprotected RNA
 conjugates (Figure 2a). Careful fractionation and pooling
 allowed recovery of full length product, which was desalted,
 lyophilized and resuspended in H₂O. No solubility issues were
 observed during the process in spite of the macrozwitterionic
 nature of the compounds.

Characterization of the Phosphospermine-Oligori-
nucleotide Conjugates. In addition to IEX-HPLC
 analysis (Figure 2b), an alternative method for assessing the
 purity of the final product was implemented. Denaturing
 polyacrylamide gel electrophoresis (D-PAGE) is a powerful
 method for resolving mixtures of essentially linear biomolecules
 according to their length. Unfortunately, the net charge of the
 conjugates was too small for the electric field to drive the
 molecules through the gel in denaturing urea conditions used
 for nucleic acids D-PAGE. Moreover, we also experienced that
 conjugates tend to stick on glass plates. Protein D-PAGE is
 based on sodium dodecyl sulfate (SDS) detergent solubilization
 of the denaturated linear protein and its migration as anionic
 SDS micelles.²⁷ We hypothesized that the SDS/hydrophobic
 amino acid interaction could be replaced by an anionic SDS/
 cationic spermine interaction and hence allow us to resolve
 oligospermine-oligonucleotides according to their length.
 Figure 2c shows that SDS-PAGE was indeed able to resolve
 the conjugates at the phosphospermine level. Moreover, the
 presence of SDS in the loading buffer avoided conjugates'
 sticking on the glass plate before entering into the gel. Since
 conjugates were detected postelectrophoretically using ethi-
 dium bromide staining, we next asked whether this method was
 quantitative and able to assess the level of purity with respect to
 the number of phosphospermines. Increasing amounts of Z₂₅-
 and Z₃₀-RNA conjugates were loaded on a SDS-PAGE gel and
 stained with ethidium bromide after electrophoresis (Figure
 3a). While the Z₂₅-conjugate appeared as a single band, the Z₃₀-
 conjugate showed, besides a major band, a significant amount
 of impurities (Z_{n-1}-conjugates) as revealed by discrete bands
 migrating as a phosphospermine ladder. Fluorescence inten-

D

dx.doi.org/10.1021/mp300278b | Mol. Pharmaceutics XXXX, XXX, XXX-XXX

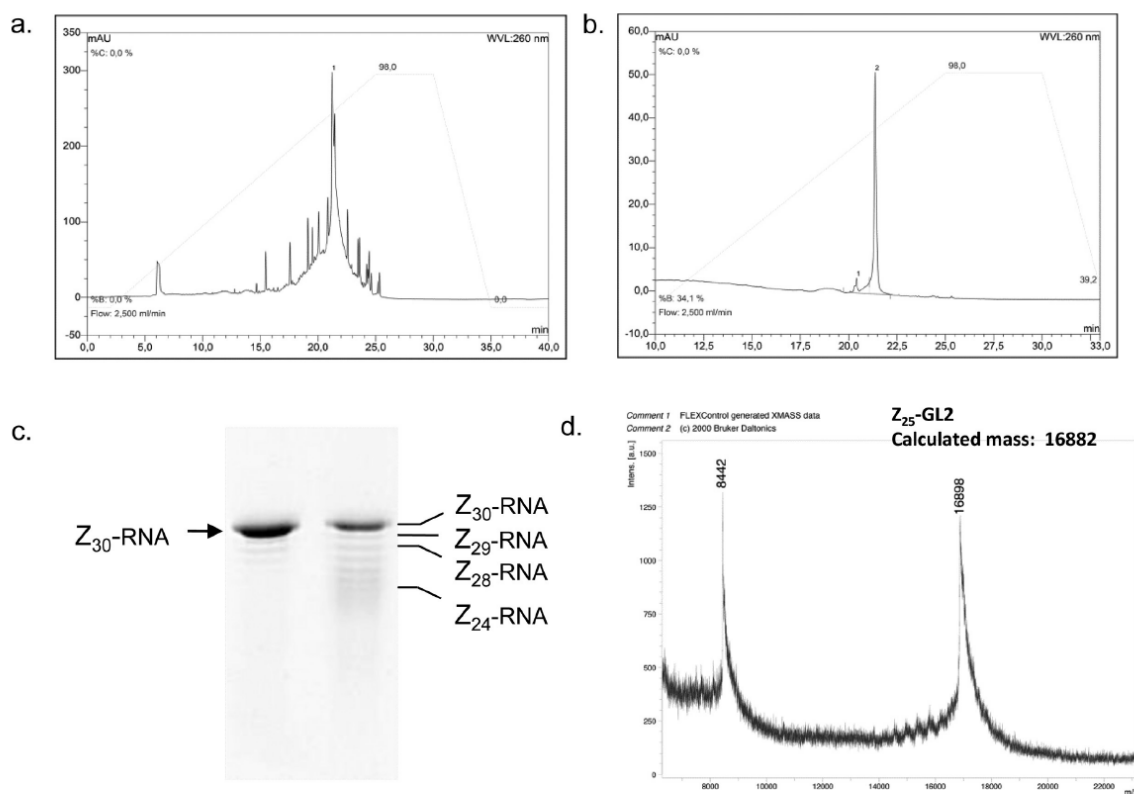


Figure 2. Purification and characterization of oligophosphospermine–oligoribonucleotide conjugates (Z_n -RNA) (see Experimental Section). Crude conjugates are typically purified using basic IEX-HPLC (a). Selected fractions are pooled and analyzed using the same HPLC procedure (b). Two fractions are analyzed using SDS–PAGE (c). Identity is achieved using MALDI-TOF mass spectrometry (d).

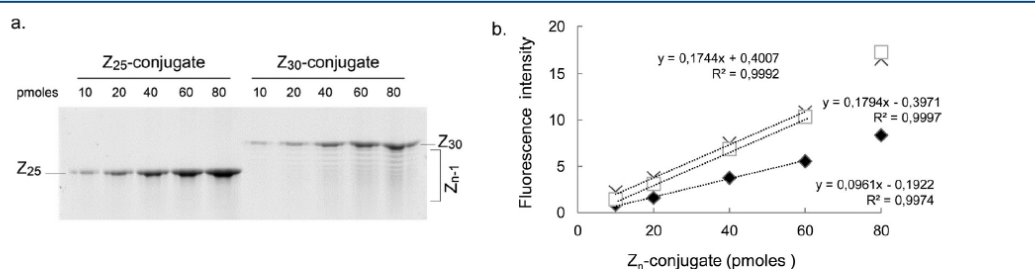


Figure 3. Purity assessment. Increasing quantities of Z_{25} - and Z_{30} -conjugates were analyzed using SDS–PAGE followed by ethidium bromide staining (a). Fluorescence intensities of discrete bands corresponding respectively to Z_{25} -conjugate (cross) and Z_{30} -conjugate (black rhombs) as well as cumulated intensities of Z_{30} -conjugate and truncates (squares) quantified using GeneTools software (Syngene) were plotted as a function of loaded quantities (b).

417 sities of full length products as well as the cumulated intensities
 418 of Z_{30} -conjugated species present in each track were quantified
 419 using dedicated software (GeneTools, Syngene). In all cases,
 420 the fluorescence increased linearly with the amount of loaded
 421 material (Figure 3b). As expected, the integrated fluorescence
 422 intensity of the Z_{25} -conjugate and the total fluorescence
 423 intensities in the Z_{30} -conjugate lane were similar, showing a
 424 good correlation between oligonucleotide amount (based on
 425 optic density measurement) and ethidium bromide fluores-
 426 cence, irrespective of the number of phosphospermines. The

427 full length over total intensities ratio showed that Z_{30} accounted
 428 for 55% of the conjugates present in the sample.

429 All batches were analyzed by SDS–PAGE, and only
 430 conjugates with at least 80% full length purity were used for
 431 subsequent experiments. With such a specification, we routinely
 432 recovered 15 nmol from a 0.5 μ mol scale oligonucleotide
 433 synthesis.

434 As a final control, conjugate molecular weights were assessed
 435 using MALDI-TOF mass spectrometry (Figure 2d). Due to the
 436 high molecular weight of the conjugates (approximating 19
 437 kDa) and their high propensity to form multiple salt adducts,

E

dx.doi.org/10.1021/mp300278b1 Mol. Pharmaceutics XXXX, XXX, XXX–XXX

438 mass spectra could not be a means to assess complete
439 deprotection and/or the oligonucleotide sequence. However,
440 spectra provided the confirmation of the number of
441 phosphospermines (± 408 Da per unit), since the difference
442 between experimental and calculated mass varied from +16 to
443 +150 Da.

444 **Formation of Conjugated siRNA and Carrier-Free**
445 **Delivery.** Cationic siRNAs consist of an oligophosphosper-
446 mine-conjugated RNA sense strand annealed with a standard
447 antisense oligoribonucleotide. Together as a duplex, they are
448 expected to be substrate of the RISC machinery like any other
449 siRNA. Assembling both strands is also critical to combine
450 functions carried out by each entity separately: the conjugate is
451 the carrier of the antisense strand which mediates gene
452 silencing. We thus worked at gaining further insight into
453 conjugated duplex formation.

454 Cationic siRNAs were formed at room temperature in
455 RNase-free water, by mixing the conjugated sense strand and
456 the complementary antisense sequence in equimolar quantities.
457 Annealing was monitored on gradient SDS-PAGE, allowing
458 visualization of both strands. As shown in Figure 4a, when both

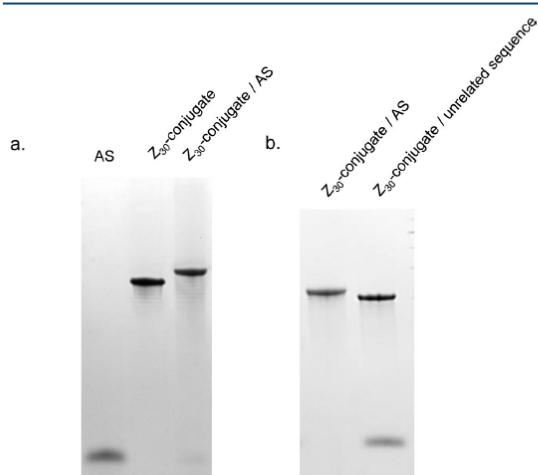


Figure 4. Cationic siRNA formation. Single-stranded Z₃₀-conjugate was mixed with the antisense strand (AS) in equimolar amount and duplex formation was observed by an electrophoretic migration shift on SDS-PAGE (SDS-Tris-Tricine 10–20%) (a). Duplex formation occurred when Z₃₀-conjugate was mixed together with its complementary AS sequence (Z₃₀/AS) while no annealing was observed when the sequences were not complementary (Z₃₀/unrelated sequence) (b).

459 strands are mixed, neither the conjugate nor the antisense
460 strand can be seen, but a novel entity with reduced
461 electrophoresis mobility appears. Interestingly, when the
462 phosphospermine-conjugated sense strand is mixed with an
463 unrelated sequence lacking complementarity (Figure 4b), both
464 strands keep migrating separately in the gel, and no retarded
465 band corresponding to a complex is observed. Taken together,
466 these data demonstrate that the retarded band observed when
467 both strands are complementary is the duplex.

468 Mixing positively and negatively charged molecules can
469 generate coprecipitates. In the case of the related complex
470 formation between polynucleotides and the cationic polymer
471 polyethylenimine, the key parameter is the amine over
472 phosphate molar ratio (N/P ratio) which determines the

473 particle charge, size and cellular delivery properties. To rule out
474 precipitation during the annealing step, we mixed the Z₂₅- and
475 Z₃₀-conjugates with varying amounts of their antisense strands
476 and performed SDS-PAGE (data not shown). While the
477 duplex was completely formed when the strand ratio was 1/1,
478 above and below this ratio the strand in excess remained as a
479 single strand. Precipitation was only observed when the
480 antisense strand was 1.5-fold in excess to the Z₂₅-conjugate,
481 or 2-fold in excess to the Z₃₀-conjugate. For the Z₂₀-conjugate,
482 precipitation occurred when mixed with the antisense strand
483 close to the 1:1 ratio required for siRNA formation. Taken
484 together, these results showed that precipitation occurred when
485 the N/P ratio was close to 4/3.

486 In summary, truly cationic siRNAs are formed with Z > 20
487 for an equimolar amount of the antisense strand. No
488 precipitation was observed unless the antisense strand was
489 added in excess. Moreover, Watson-Crick recognition between
490 a phosphospermine-conjugated RNA and its complementary
491 strand is maintained despite additional stability brought about
492 by the high number of positive charges.²¹

493 We next used a 3'-fluorescently labeled antisense strand to
494 monitor cell penetration of siRNA by direct microscopic
495 observation. When the siRNA lacking spermines was delivered
496 with a cationic lipid, the fluorescent signal appeared mainly
497 distributed as a few rather large spots within the cell (Figure
498 5a), presumably endocytotic vesicles.²⁸ When incubated with
499 annealed Z₂₅-conjugated siRNA, every cell exhibited an
500 intracellular fluorescence (Figure 5b). Although some diffuse
501 signal could be observed in some cells, the conjugated siRNA
502 appeared essentially distributed following a punctate pattern,
503 the high number of spots throughout the cytosol demonstrating
504 an efficient cell entry. We also made the important observation
505 that a Z₃₀-conjugated oligonucleotide unable to anneal with the
506 antisense strand due to the lack of sequence complementarity
507 (Figure 5b) was unable to deliver the antisense strand into cells
508 (Figure 5c). Moreover, no intracellular fluorescence was
509 observed when the strands were complementary, but the
510 antisense strand in excess induced precipitation at the annealing
511 step. Taken together, these results show that cationic siRNAs
512 are able to enter cells in the absence of any carrier. Cell
513 penetration requires complementary RNA strands properly
514 annealed in a 1 to 1 ratio. This strongly suggests that they
515 interact not with the cell membrane as preexisting particles
516 formed upon electrostatic interactions but, instead, as non-
517 aggregated molecules. In the cell, they exhibit a vesicular
518 pattern which is in favor of an endocytotic cell uptake
519 mechanism.

520 **Relationship between Uptake, Activity and the**
521 **Number of Phosphospermines.** As a preliminary proof-of-
522 principle of self-delivery using cationic siRNAs, we previously
523 reported that a Z₃₀-conjugated siRNA was able to specifically
524 knock down luciferase expression in A549Luc cells in the
525 absence of serum, while the Z₂₀-conjugated siRNA had no
526 effect.²³ To further investigate the impact of overall charge on
527 conjugated-siRNA activity, A549Luc cells were incubated with
528 100 nM luciferase targeting cationic siRNAs containing either
529 20, 25, 30 or 35 phosphospermines (Figure 6a). In the absence
530 of serum in the culture medium for the first 4 h of incubation,
531 95% silencing was achieved with Z₂₅, Z₃₀ and Z₃₅ species, a
532 value similar to that obtained with 10 nM standard siRNA
533 formulated with a commercially available cationic lipid
534 transfection reagent. Nonconjugated siRNA alone at the
535 concentration 100 nM had no activity. It is noteworthy that

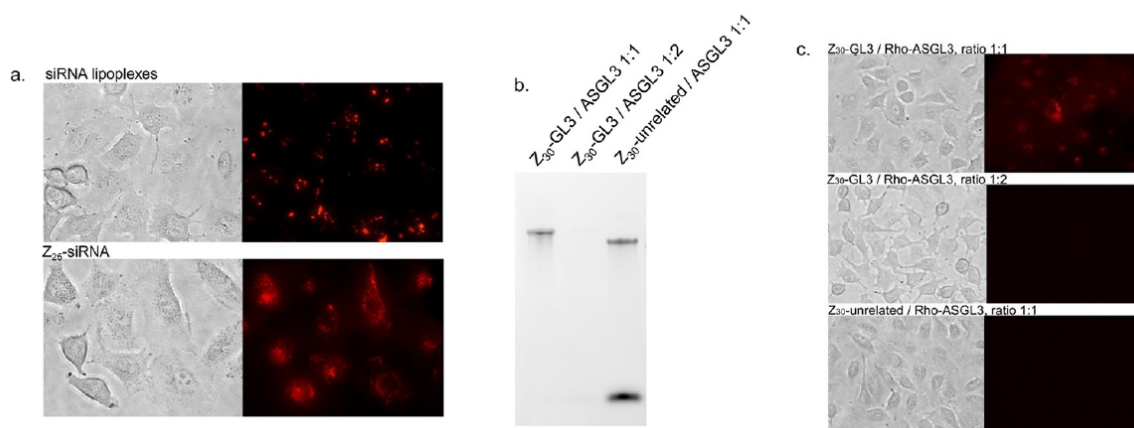


Figure 5. Cationic siRNAs enter cells in the absence of transfection reagent. (a) Observation of A549Luc cells incubated for 24 h in the presence of serum with Rhodamine-siRNA (10 nM) delivered with the cationic lipid transfection reagent INTERFERin (upper panel), or Rhodamine-Z₂₅-cationic siRNA (100 nM) (lower panel). (b) Rhodamine labeled GL3 antisense strand (ASGL3) was mixed with sense strand Z₃₀-GL3 (molar ratio 1:1 and 2:1) or with Z₃₀-unrelated sequence (molar ratio 1:1). Samples were monitored for duplex formation by SDS-PAGE (Tris-Tricine 10–20%), and (c) used for incubation with A549Luc cells (100 nM). Cells were observed 24 h postincubation.

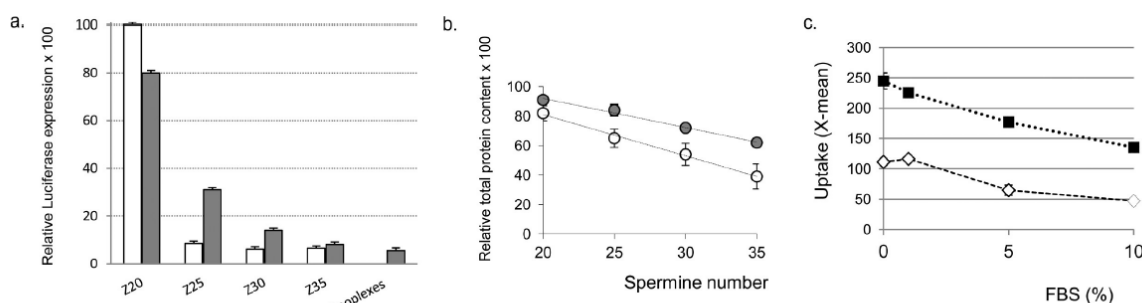


Figure 6. Phosphospermine number and serum impact. (a, b) A549Luc cells were incubated with 100 nM of cationic siRNAs GL3 targeting the luciferase gene and carrying 20 to 35 phosphospermine moieties, in the absence of serum for 4 h (white bars or circles) or in serum containing medium (gray bars or circles). As a positive control, cells were transfected with 10 nM lipoplexes (GL3/INTERFERin). 48 h postincubation, cells were analyzed for luciferase activity (a) and total protein content (b). Data are expressed as the percentage of luminescence unit (RLU) relative to untreated cells (a) or percentage of total protein content relative to untreated cells (b). Each point is the mean of three samples \pm SD. (c) A549Luc cells were incubated with 100 nM fluorescently labeled cationic siRNAs, carrying 25 (white rhombs) and 30 (black squares) phosphospermine moieties in the presence of increasing amount of fetal bovine serum in the cell culture medium. 24 h postincubation, uptake was examined by flow cytometry. Data are expressed as the mean fluorescence intensity per cell (X -mean), and each point is the mean of three samples \pm SD.

536 the improved conjugate synthesis and purification procedure
 537 led to a significant decrease in effective concentration (by a
 538 factor of 5), since Z₃₀-siRNA was previously reported to require
 539 a 500 nM concentration to display a similar activity.²³ However,
 540 despite purification, Z₂₀-siRNA was inefficient at this
 541 concentration, as previously observed.

542 In the presence of serum, we surprisingly discovered that
 543 cationic siRNA with a natural ribonucleotide backbone
 544 remained active. Though silencing was slightly reduced for
 545 Z₂₅-conjugated siRNA, serum perturbation disappeared upon
 546 increasing the number of phosphospermine units to 30 and 35.

547 In parallel to activity, a charge-dependent decrease in total
 548 protein content per well was also observed, which may be
 549 attributed to cell toxicity (Figure 6b). Interestingly, serum
 550 appeared to have a protective effect.

551 We next asked whether the charge-dependent activity could
 552 be the consequence of differential cell uptake efficiencies. To
 553 this end, A549Luc cells were incubated with fluorescently

554 labeled Z₂₅- or Z₃₀-conjugated siRNAs, in the absence or
 555 presence of an increasing percentage of fetal bovine serum in
 556 the culture medium. Intracellular fluorescence was monitored
 557 by flow cytometry 24 h postincubation (Figure 6c). We first
 558 found that all cells exhibited a fluorescent signal, confirming
 559 that cationic siRNAs were taken up by 100% cells. The amount
 560 of Z₃₀-conjugated siRNAs per cell, expressed as the median
 561 fluorescence intensity per cell (x -mean value), was higher than
 562 for its Z₂₅ counterpart. The same observation was made when
 563 comparing Z₃₅- and Z₃₀-conjugated siRNAs (data not shown),
 564 indicating that the level of uptake is actually modulated by the
 565 number of phosphospermine units, with the more cationic the
 566 siRNA, the more efficiently it enters cells. Intracellular levels of
 567 both Z₂₅- and Z₃₀-conjugated siRNAs were decreasing with
 568 serum concentration increase, achieving 50% and 30%
 569 reduction at 10% FBS, respectively. It is thus likely that
 570 reduced uptake is the major reason for the slight decrease in

G

dx.doi.org/10.1021/mp300278b1 Mol. Pharmaceutics XXXX, XXX, XXX–XXX

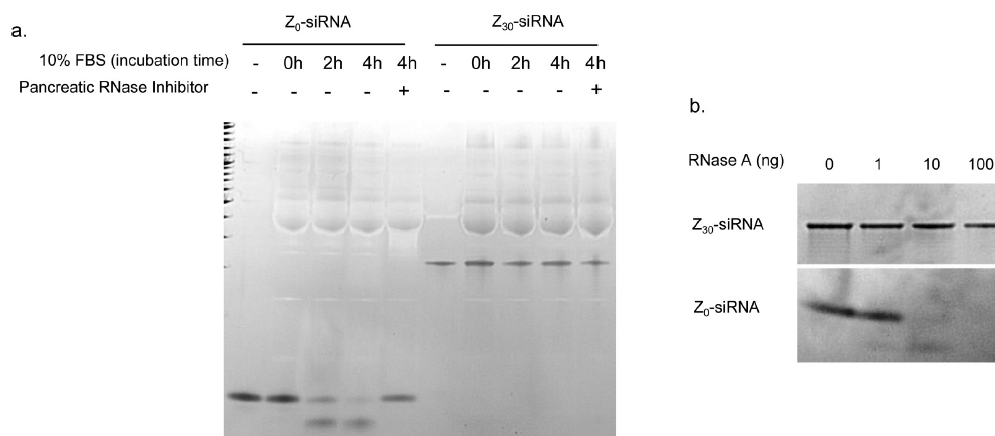


Figure 7. Z₃₀-conjugated siRNA is not degraded by serum components and pancreatic ribonucleases. 1.5 μg of nonconjugated Z₀-siRNA or Z₃₀-siRNA was incubated in 6 μL of FBS 10% at 37 °C, in the absence or in the presence of pancreatic ribonuclease inhibitor (a). 50 pmol of Z₀-siRNA or Z₃₀-siRNA was incubated in the presence of 0, 1, 10 or 100 ng of RNase A for 2 h at 37 °C (b). Samples were analyzed on SDS–Tris–Tricine polyacrylamide 10–20% gel followed by ethidium bromide staining.

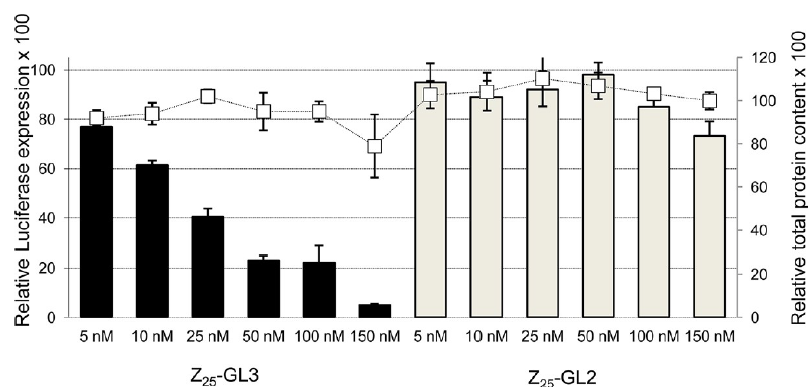


Figure 8. Cationic siRNAs induce specific and dose-responsive gene silencing. A549Luc cells were incubated in the presence of serum with increasing amount of Z₂₅ cationic siRNAs targeting the luciferase GL3 gene (Z₂₅-GL3) or the negative control Z₂₅-GL2 displaying 3 mismatches with the luciferase GL3 sequence. 48 h postincubation, cells were analyzed for luciferase activity and total protein content as described in the Experimental Section. Data are expressed as the percentage of luminescence unit (RLU)/μg of protein relative to untreated cells (left Y-axis, bars) or percentage of total protein content relative to untreated cells (squares). Each point is the mean of three samples ± SD in a representative experiment.

571 activity observed when cells were incubated in the presence of
572 serum.

573 **Stability of Cationic siRNAs in Serum.** RNase A-like
574 activities have been shown to lead to fast siRNA degradation in
575 blood serum.^{26,29} The observation that cationic siRNAs
576 remained active in serum conditions suggests that the
577 molecules were not extensively degraded prior to being taken
578 up by the cells. To examine their resistance toward nuclease
579 hydrolysis, a conjugated Z₃₀-siRNA and its nonconjugated
580 counterpart were incubated in 10% fetal bovine serum and
581 analyzed over time using SDS–PAGE (Figure 7a). We
582 confirmed that the control siRNA was degraded within 4 h
583 incubation in serum, and that degradation was prevented by
584 addition of a RNase A inhibitor. Under the same conditions,
585 Z₃₀-conjugated siRNA remained unaffected. Similar experi-
586 ments were performed with lower homologues containing 5
587 and 10 phosphospermines, and although some degradation was
588 observed, robust stabilization was still observed (data not

589 shown). We further conducted degradation assays using
590 increasing amounts of purified bovine RNase A (Figure 7b).
591 Again, Z₃₀-siRNA remained intact while the nonconjugated
592 control was completely digested.

593 These data demonstrate that an oligophosphospermine tail
594 prevents the siRNA moiety from serum-induced degradation.
595 This finding confirms that the slight decrease in uptake that was
596 observed upon addition of serum was not due to degradation.
597 Instead, it might argue for an interaction between cationic
598 siRNAs and serum components, which would interfere with or
599 compete for binding to membranes and subsequent internal-
600 ization. As a negatively charged carrier protein and major serum
601 component, albumin is an obvious candidate.

602 **Silencing Specificity and RISC Signature.** We examined
603 the mechanism by which cationic siRNAs suppress gene
604 expression. To address the question of specificity, A549Luc
605 cells were incubated in the presence of serum with various
606 amounts of Z₂₅-siRNA targeting the expressed GL3 luciferase

H

dx.doi.org/10.1021/mp300278b | Mol. Pharmaceutics XXXX, XXX, XXX–XXX

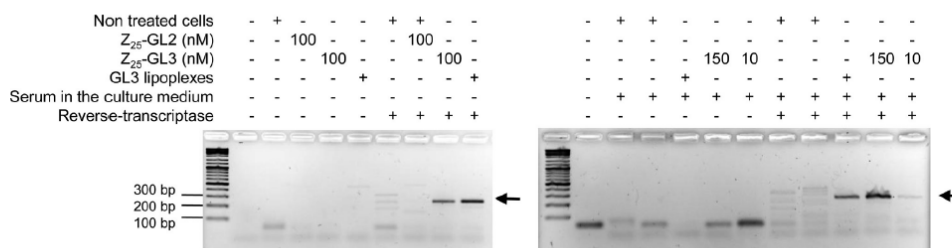


Figure 9. Cationic siRNAs mediate gene silencing through RNA interference mechanism. A549Luc was incubated in the presence or in the absence of serum for 4 h with Z₂₅-GL3 targeting the luciferase gene or Z₂₅-GL2 mismatch or transfected with standard GL3 siRNA/INTERFERin lipoplexes. Total RNA was extracted 48 h post-treatment, and submitted to 5'RACE assays as described in the Experimental Section. PCR reactions were analyzed on 3% agarose gel to visualize the 255 bp RNA-induced silencing complex RISC-mediated cleavage product (arrow).

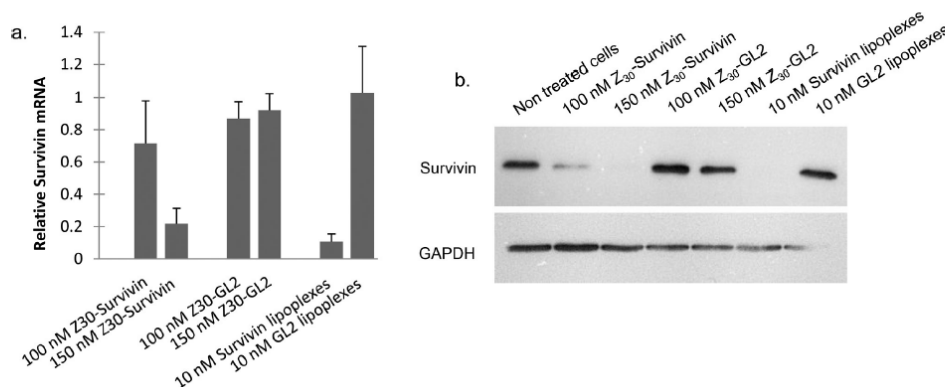


Figure 10. Survivin transcript and protein are significantly decreased upon incubation with survivin targeting cationic siRNAs in B16-F10 melanoma cell. B16-F10 cells were incubated in the presence of serum with Z₃₀-survivin, Z₃₀-GL2 control or nonconjugated siRNA/INTERFERin particles. Survivin mRNA was quantified by RT-qPCR 18 h postincubation using HPRT1 as reference gene for normalization. Bars are the expression relative to untreated samples and represent the mean of three independent experiments. SD are indicated (a). Survivin protein was detected in cellular extracts prepared 48 h postincubation. GAPDH was used as loading control (b).

607 gene (Z₂₅-GL3) or with another luciferase sequence presenting
 608 three mismatches (Z₂₅-GL2). As shown in Figure 8, Z₂₅-GL3
 609 displayed dose-responsive gene silencing with IC₅₀ value in the
 610 range of 25 nM without toxicity, whereas Z₂₅-GL2 had no effect
 611 on the cells.

612 Next, it was crucial to investigate whether the specific gene
 613 silencing occurred through an RNAi mechanism. Indeed, the
 614 long phosphospermine tail at the 5' end of the sense strand
 615 might impede RISC binding or activity. We thus carried out
 616 rapid amplification of cDNA ends (5'RACE) analysis as
 617 previously used by others to demonstrate the specific cleavage
 618 of the target mRNA.¹⁴ Cells treated with Z₂₅-GL3, or with Z₂₅-
 619 GL2 or GL3 standard siRNA vectorized with a cationic lipid as
 620 controls, were analyzed 48 h post-treatment. As depicted in
 621 Figure 9, a PCR product of the expected size (255 bp) was
 622 found in samples incubated with Z₂₅-GL3 in the absence or in
 623 the presence of serum, as well as in cells transfected with
 624 standard siRNA GL3/cationic lipid complexes. The sequencing
 625 of the amplicons confirmed the cleavage of the target at the
 626 expected site (Supplementary Figure 1 in the Supporting
 627 Information). Strikingly, the RNAi signature was even present
 628 in the sample from cells incubated with 10 nM Z₂₅-GL3 in the
 629 presence of serum. No specific cleavage product was detected
 630 from samples treated with Z₂₅-GL2.

631 **Knockdown of a Cellular Gene.** To examine the cationic
 632 siRNA activity in a more relevant cellular model, we targeted

the survivin gene in B16F-10 murine melanoma cells. Survivin
 633 is a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family
 634 which plays a role in suppression of apoptosis, regulation of cell
 635 division and cell motility. It is overexpressed in numerous
 636 human cancers, and as such, it is a prominent anticancer
 637 target.³⁰⁻³²

638
 639 B16-F10 cells were incubated with Z₃₀-survivin cationic
 640 siRNA in the presence of serum, and we analyzed the activity at
 641 both the transcript and protein levels. As shown in Figure 10a,
 642 the Z₃₀-conjugated survivin siRNA led to a 28% and 78%
 643 reduction of survivin mRNA, at 100 nM and 150 nM,
 644 respectively. In comparison, the same concentrations of control
 645 Z₃₀-GL2 conjugated siRNA had no effect. Survivin mRNA
 646 knockdown persisted 48 h postincubation (data not shown),
 647 inducing a drastic decrease in protein level (Figure 10b).

648 Finally, to assess the activity of a cationic siRNA at the
 649 cellular level, we targeted the nuclear envelope protein
 650 LaminA/C in HeLa cells, using a Z₂₅-conjugated siRNA.¹
 651 The protein was detected by immunocytochemistry using a
 652 specific LaminA/C antibody. In agreement with the observation
 653 that conjugated siRNAs were able to enter into all plated cells,
 654 LaminA/C expression was reduced in the entire cell population
 655 incubated with the target cationic siRNA (Supplementary
 656 Figure 2 in the Supporting Information).

657 Together with the data described above, this result showing
 658 that efficient cationic siRNAs mediated gene silencing in a third

659 mammalian cell line, and on a third target gene, provides the
660 general demonstration that oligophosphospermine conjugated
661 siRNAs trigger the inhibition of gene expression, in a carrier-
662 free manner.

663 ■ DISCUSSION

664 Following our earlier finding that cationic siRNAs were able to
665 mediate carrier-free gene silencing in animal cells, we here
666 concentrated our efforts toward improving the synthesis and
667 characterization of the conjugates. We then explored in detail
668 their activity and the mechanism by which they mediate gene
669 expression inhibition.

670 Conceptually, a cationic siRNA bears an overall positive
671 charge in order to favor binding and clustering of cell-surface
672 syndecans and trigger endocytosis.⁹ As a potential drug, it must
673 also remain as a molecule in solution to benefit from intratissue
674 diffusion properties more favorable than those of nanoparticles.
675 However, playing with charge may induce aggregation that
676 could end up with solubility issues. In this respect, there are two
677 critical steps in the formation of a soluble cationic siRNA: the
678 synthesis of the highly cationic conjugated sense strand and the
679 annealing step which brings about novel anionic charges carried
680 by the antisense strand.

681 The oligophosphospermine–oligonucleotide conjugates
682 were synthesized stepwise on solid supports following the
683 phosphoramidite chemistry. This process allowed straightfor-
684 ward variation of the global charge which was the key
685 parameter supposed to modulate both physical and biological
686 properties of the conjugates. According to the phosphoramidite
687 chemistry developed, the interspermine phosphodiester link-
688 ages introduced a negative charge for every spermine block,
689 thus providing three potential positive charges per spermine
690 unit. Stepwise synthesis consisting of an iterative process
691 reduced the overall yield and required large excess amounts of
692 the polyamine synthon at each step. Facing this problem, we
693 have increased the phosphoramidite spermine coupling yield to
694 98%. However, a polydisperse crude material was generated.
695 IEX-HPLC purification was then developed, and even if the
696 resolution could be further improved, fractions containing
697 >80% full length product could be obtained. Importantly, while
698 direct conjugation of oppositely charged polymers in solution is
699 known to represent a challenge in terms of solubility, our
700 synthetic route also provided soluble conjugates.

701 Duplex formation could compromise solubility, since novel
702 neutralizing charges are provided by the antisense strand. This
703 has been observed previously for conjugates containing highly
704 cationic peptides.¹⁹ With the exception of the Z_{20} -conjugate, we
705 found that mixing the conjugated strand with its comple-
706 mentary sequence in equimolar quantities allowed duplexes to
707 form and remain soluble in water. Interestingly, precipitation
708 did occur for a given excess of the antisense strand that
709 depended on the number of phosphospermine units of the
710 sense strand: 2-fold and 1.5-fold excess for Z_{30} - and Z_{25} -
711 conjugates, respectively. For the Z_{20} -conjugate, precipitation
712 already occurred during duplex formation, i.e., at a molar ratio
713 1:1. In all cases mentioned above where precipitation was
714 observed, the amine over phosphate ratio (N/P) was 4/3. This
715 finding suggests that electroneutrality was achieved at this
716 specific ratio, indicating that ca. 3 amines out of 4 per
717 phosphospermine unit were protonated on average at pH 7.
718 Another observation we made here was that the high number of
719 cationic charges did not interfere with base-pairing specificity.
720 We have previously shown that conjugation of a small number

of phosphospermine units that provided compounds which
remained negatively charged did not affect the ability of the
oligonucleotide to discriminate a mismatch.^{22,33} Here, single-
mismatch discrimination was not addressed, but despite the
high number of phosphospermine moieties, conjugates retained
their ability to recognize their complementary sequence since
they did not form duplexes with unrelated sequences.

For the first time, we have visualized cell entry of the cationic
siRNAs. They effectively enter every cell in culture. Moreover, a
couple of observations support the fact that cationic siRNAs are
delivered as single molecules, or at least not as large aggregates.
First, the antisense strand cannot be delivered by an unrelated
conjugate sequence, showing that proper duplex formation is
required. Second, the precipitate generated by the addition of the
antisense strand beyond the 1/1 ratio of each strand was
inhibiting both cell penetration and activity.

The mechanism of cell entry is not known, although it
probably parallels the way cationic vectors carry polynucleo-
tides into cells.⁹ Indeed, we show here that cell entry is strictly
dependent on the number of phosphospermine units, and the
more cationic, the more efficiently conjugated siRNAs enter
cells. Fluorescent cationic siRNAs were seen to be distributed
with a punctate pattern in the cytoplasm together with some
diffuse signal, suggesting endocytosis-mediated cell entry and
partial release from vesicles. Since oligonucleotide distribution
can be affected by conjugation of a fluorophore, we verified that
fluorescently labeled conjugated molecules display the same
activity as their nonlabeled counterparts.

The number of phosphospermine units governing solubility
and cell delivery, it is not surprising it is also governing gene
silencing. While the Z_{20} -conjugate had no activity, gene
silencing was already robust for the Z_{25} -conjugated siRNA in
the absence of serum. Increasing the number of phosphosper-
mines beyond 25 did not increase activity further, except in the
presence of serum where protein binding may interfere. In our
first study, similar efficacies were achieved only at a significantly
higher Z_{30} -siRNA concentration, which was probably a
consequence of poor conjugate purity and hence nondefined
heterogeneous mixture following duplex formation. Here,
cationic siRNAs are shown to be effective at submicromolar
concentrations ranging from 25 to 150 nM, which are much
lower than 1–10 μ M concentrations reported for lipophilic
siRNA, cholesterol–siRNAs or CPP-conjugated siRNAs.^{17,34}
Nevertheless, active concentrations of cationic siRNAs are still
an order of magnitude higher than those used for standard
siRNA formulated with a cationic lipid. Cationic lipid/
polynucleotides particles have been shown to sediment onto
adherent cells in culture and to be completely taken up within 4
h.³⁵ Yet sedimentation does not occur *in vivo* where particle
diffusion is a barrier rather than an advantage. In sharp contrast,
 Z_{30} -siRNA molecules evenly reach the surface of all cells by
Brownian motion, but we do not know how complete this
process can be, which makes comparison with particles difficult.
In any case, dealing with a molecular drug should lead to a
more favorable tissue biodistribution.

Another factor which may be considered is the behavior of
phosphospermine-conjugated cationic siRNAs in endosomes
with respect to formulated siRNAs into particles. According to
the spermine-based structure of the conjugates, their release
most probably involves proton sponge-mediated endosome
swelling and rupture, as described for polyethylenimine
(PEI)^{9,36} and lipopolyspermine.³⁷ However, the intraendo-
somal concentration of buffering, nonprotonated amines that can

784 be reached with molecules is probably lower than with a
785 particle, the phosphospermine structure offering a lower
786 protonable capacity (1/4, see above) as compared to PEI
787 complexes (ca. 1/2). However, the cell observation after
788 incubation with fluorescent cationic siRNAs indicated the
789 presence of a vesicular pattern and some diffuse signal in the
790 cytoplasm, suggesting that a partial release from endocytotic
791 vesicles occurs. Future investigations are needed to elucidate
792 the mechanism of cell entry of these molecules and their
793 efficacy to escape from endosomes.

794 Mechanistically, we clearly demonstrated here that cationic
795 siRNAs operate through the RNAi pathway, mediating cleavage
796 of the target mRNA, its subsequent degradation and inhibition
797 of the target protein synthesis. However, the large oligophos-
798 phospermine tail may affect the interaction with RISC or limit
799 duplex unwinding. While low internal stability favors unwinding
800 and subsequent activity,³⁸ phosphospermine conjugation on the
801 contrary increases duplex stability.^{21,22} Moreover, the first event
802 facilitating strand dissociation is RISC-mediated cleavage of the
803 sense strand between positions 9 and 10^{39–41} and the conjugate
804 might affect this enzymatic cleavage. More work has to be done
805 to address these questions, but if the activity is shown to be
806 affected by conjugation, “second generation” cationic siRNAs
807 containing a cleavable disulfide or ester bond between the
808 siRNA and the polycation could be developed to improve their
809 efficacy. On the positive side, conjugation at the 5' end of the
810 sense strand should avoid off-target effects triggered by the
811 sense strand.⁴²

812 Finally, the present study was exclusively focused on the
813 conjugated moiety of cationic siRNAs, and data have been
814 obtained using the standard siRNA design as described by
815 Tuschl and collaborators. This means that there is room for
816 improving the activity, by optimizing the sequences or end
817 features. The introduction of modifications in the oligonucleo-
818 tide part may also enhance the potency.

819 Cationic siRNAs are less effective than nanoparticles *in vitro*,
820 but this does not hamper their potential as gene silencing drugs
821 *in vivo*. Along this line, an important and even somewhat
822 surprising finding of the present study is that cationic siRNAs
823 remain active in the presence of serum. The slight decrease in
824 activity upon addition of serum is correlated with a decrease in
825 intracellular concentration and may be compensated by
826 increasing the overall positive charge. We further have shown
827 that cationic siRNAs are not degraded in serum-containing
828 culture medium. The oligophosphospermine tail is thus
829 protecting the siRNA against nucleases. It is also responsible
830 for interaction with serum components, among which albumin
831 is the most probable candidate. Albumin is a transport protein
832 for numerous endogenous and exogenous compounds. In
833 support of our hypothesis, albumin has been shown to
834 reversibly bind polyamines and claimed to be their blood
835 carrier.^{45,44} Moreover, it improves the half-life of many
836 therapeutically active compounds,^{45,46} which is making a
837 hopeful start for our next goal: validate the *in vivo* gene
838 silencing of cationic siRNAs.

839 ■ ASSOCIATED CONTENT

840 ⑤ Supporting Information

841 Supplementary table describing the sequence location of
842 primers and probes used in RT-qPCR. Supplementary Figure
843 1 showing sequencing traces of the PCR products obtained in
844 the 5'RACE assay. Supplementary Figure 2 showing LaminA/C
845 expression inhibition in HeLa cells following incubation with

Z₂₅-laminA/C cationic siRNA. This material is available free of
charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

846 ■ AUTHOR INFORMATION

847 Corresponding Author

*Polyplus-transfection, Bioparc, Boulevard S. Brant, 67401
Illkirch, France. E-mail: nlenne@polyplus-transfection.com.
Phone: +33 390 406 470. Fax: +33 390 406 181.

852 Author Contributions

†These authors contributed equally.

854 Notes

The authors declare no competing financial interest.

857 ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors warmly thank Pascale Belguise (Polyplus-trans-
fection) for the critical reading of the manuscript. This work
was supported by Oséo Innovation [A1006001A] and Conseil
Régional d'Alsace [A1006001A CR].

862 ■ REFERENCES

- (1) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494–8.
- (2) Ding, S. W.; Voinnet, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **2007**, *130* (3), 413–26.
- (3) Tomari, Y.; Zamore, P. D. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* **2005**, *19* (5), 517–29.
- (4) Valencia-Sanchez, M. A.; Liu, J.; Hannon, G. J.; Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **2006**, *20* (5), 515–24.
- (5) Berezina, S. Y.; Supekova, L.; Supek, F.; Schultz, P. G.; Deniz, A. A. siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (20), 7682–7.
- (6) Ohrt, T.; Muetze, J.; Svoboda, P.; Schwill, P. Intracellular localization and routing of miRNA and RNAi pathway components. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (2), 79–88.
- (7) Robb, G. B.; Brown, K. M.; Khurana, J.; Rana, T. M. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12* (2), 133–7.
- (8) Juliano, R.; Bauman, J.; Kang, H.; Ming, X. Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6* (3), 686–95.
- (9) Behr, J.-P. Synthetic Gene Transfer Vectors II: Back to the Future. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 980–4.
- (10) Peer, D.; Lieberman, J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. *Gene Ther.* **2011**, *18* (12), 1127–33.
- (11) Bumett, J. C.; Rossi, J. J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (1), 60–71.
- (12) Manoharan, M. Oligonucleotide conjugates as potential antisense drugs with improved uptake, biodistribution, targeted delivery, and mechanism of action. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12* (2), 103–28.
- (13) Juliano, R.; Alam, M. R.; Dixit, V.; Kang, H. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (12), 4158–71.
- (14) 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, L.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Kotliansky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vormlocher, H. P. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **2004**, *432* (7014), 173–8.
- (15) 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.; Kotliansky, V.; Manoharan, M.; Stoffel, M.

K

dx.doi.org/10.1021/mp300278b | Mol. Pharmaceutics XXXX, XXX, XXX–XXX

- 909 Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs.
910 *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (10), 1149–57.
- 911 (16) Alam, M. R.; Ming, X.; Fisher, M.; Lackey, J. G.; Rajeev, K. G.;
912 Manoharan, M.; Juliano, R. L. Multivalent cyclic RGD conjugates for
913 targeted delivery of small interfering RNA. *Bioconjugate Chem.* **2011**,
914 *22* (8), 1673–81.
- 915 (17) Moschos, S. A.; Jones, S. W.; Perry, M. M.; Williams, A. E.;
916 Erjefalt, J. S.; Turner, J. J.; Barnes, P. J.; Sproat, B. S.; Gait, M. J.;
917 Lindsay, M. A. Lung delivery studies using siRNA conjugated to
918 TAT(48–60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene
919 expression and induction of innate immunity. *Bioconjugate Chem.*
920 **2007**, *18* (5), 1450–9.
- 921 (18) Muratovska, A.; Eccles, M. R. Conjugate for efficient delivery of
922 short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.*
923 **2004**, *558* (1–3), 63–8.
- 924 (19) Turner, J. J.; Jones, S.; Fabani, M. M.; Ivanova, G.; Arzumanov,
925 A. A.; Gait, M. J. RNA targeting with peptide conjugates of
926 oligonucleotides, siRNA and PNA. *Blood Cells Mol. Dis.* **2007**, *38*
927 (1), 1–7.
- 928 (20) Moreau, V.; Voirin, E.; Paris, C.; Kotera, M.; Nothisen, M.;
929 Remy, J. S.; Behr, J. P.; Erbacher, P.; Lenne-Samuel, N. Zip Nucleic
930 Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR
931 and reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (19), e130.
- 932 (21) Noir, R.; Kotera, M.; Pons, B.; Remy, J. S.; Behr, J. P.
933 Oligonucleotide-oligospermine conjugates (zip nucleic acids): a
934 convenient means of finely tuning hybridization temperatures. *J. Am.*
935 *Chem. Soc.* **2008**, *130* (40), 13500–5.
- 936 (22) Pons, B.; Kotera, M.; Zuber, G.; Behr, J. P. Online synthesis of
937 diblock cationic oligonucleotides for enhanced hybridization to their
938 complementary sequence. *ChemBioChem* **2006**, *7* (8), 1173–6.
- 939 (23) Nothisen, M.; Kotera, M.; Voirin, E.; Remy, J. S.; Behr, J. P.
940 Cationic siRNAs provide carrier-free gene silencing in animal cells. *J.*
941 *Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (49), 17730–1.
- 942 (24) Gagnon, K. T.; Watts, J. K.; Pendergraft, H. M.; Montailier, C.;
943 Thai, D.; Potier, P.; Corey, D. R. Antisense and antigene inhibition of
944 gene expression by cell-permeable oligonucleotide-oligospermine
945 conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (22), 8404–7.
- 946 (25) Voirin, E.; Behr, J. P.; Kotera, M. Versatile synthesis of
947 oligodeoxyribonucleotide-oligospermine conjugates. *Nat. Protoc.* **2007**,
948 *2* (6), 1360–7.
- 949 (26) Haupenthal, J.; Baehr, C.; Kiemayer, S.; Zeuzem, S.; Piiper, A.
950 Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss
951 of silencing activity of siRNAs in serum. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*
952 (5), 702–10.
- 953 (27) Westerhuis, W. H.; Sturgis, J. N.; Niederman, R. A. Reevaluation
954 of the electrophoretic migration behavior of soluble globular proteins
955 in the native and detergent-denatured states in polyacrylamide gels.
956 *Anal. Biochem.* **2000**, *284* (1), 143–52.
- 957 (28) Kopatz, L.; Remy, J. S.; Behr, J. P. A model for non-viral gene
958 delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin.
959 *J. Gene Med.* **2004**, *6* (7), 769–76.
- 960 (29) Turner, J. J.; Jones, S. W.; Moschos, S. A.; Lindsay, M. A.; Gait,
961 M. J. MALDI-TOF mass spectral analysis of siRNA degradation in
962 serum confirms an RNase A-like activity. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3* (1),
963 43–50.
- 964 (30) McKenzie, J. A.; Grossman, D. Role of the apoptotic and mitotic
965 regulator survivin in melanoma. *Anticancer Res.* **2012**, *32* (2), 397–
966 404.
- 967 (31) Mita, A. C.; Mita, M. M.; Nawrocki, S. T.; Giles, F. J. Survivin:
968 key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer
969 therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (16), 5000–5.
- 970 (32) Seth, S.; Matsui, Y.; Fosnaugh, K.; Liu, Y.; Vaish, N.; Adami, R.;
971 Harvie, P.; Johns, R.; Severson, G.; Brown, T.; Takagi, A.; Bell, S.;
972 Chen, Y.; Chen, F.; Zhu, T.; Fam, R.; Maciagiewicz, I.; Kwang, E.;
973 McCutcheon, M.; Farber, K.; Charnley, P.; Houston, M. E., Jr.; So, A.;
974 Templin, M. V.; Polisky, B. RNAi-based therapeutics targeting survivin
975 and PLK1 for treatment of bladder cancer. *Mol. Ther.* **2011**, *19* (5),
976 928–35.
- (33) Paris, C.; Moreau, V.; Deglane, G.; Voirin, E.; Erbacher, P.;
977 Lenne-Samuel, N. Zip nucleic acids are potent hydrolysis probes for
978 quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (7), e95. 979
- (34) Petrova, N. S.; Chemikov, I. V.; Meschaninova, M. I.;
980 Dovydenko, I. S.; Venyaminova, A. G.; Zenkova, M. A.; Vlassov, V.
981 V.; Chemolovskaya, E. L. Carrier-free cellular uptake and the gene-
982 silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the
983 length of the linker between siRNA and lipophilic group. *Nucleic Acids*
984 *Res.* **2012**, *40* (5), 2330–44. 985
- (35) Barthel, F.; Remy, J. S.; Loeffler, J. P.; Behr, J. P. Gene transfer
986 optimization with lipospermine-coated DNA. *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*
987 (6), 553–60. 988
- (36) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.;
989 Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A versatile vector for gene and
990 oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: poly-
991 ethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92* (16), 7297–301. 992
- (37) Labat-Moleur, F.; Steffan, A. M.; Brisson, C.; Perron, H.;
993 Feugeas, O.; Furstemberger, P.; Oberling, F.; Brambilla, E.; Behr, J. P.
994 An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer
995 with lipopolyamines. *Gene Ther.* **1996**, *3* (11), 1010–7. 996
- (38) Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D. Functional siRNAs
997 and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **2003**, *115* (2), 209–16. 998
- (39) Leuschner, P. J.; Ameres, S. L.; Kueng, S.; Martinez, J. Cleavage
999 of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. 1000
EMBO Rep. **2006**, *7* (3), 314–20. 1001
- (40) Matrangola, C.; Tomari, Y.; Shin, C.; Bartel, D. P.; Zamore, P. D.
1002 Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-
1003 containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **2005**, *123* (4), 607–20. 1004
- (41) Rand, T. A.; Petersen, S.; Du, F.; Wang, X. Argonaute2 cleaves
1005 the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **2005**, *123*
1006 (4), 621–9. 1007
- (42) Chen, P. Y.; Weinmann, L.; Gaidatzis, D.; Pei, Y.; Zavolan, M.;
1008 Tuschl, T.; Meister, G. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA
1009 duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA*
1010 **2008**, *14* (2), 263–74. 1011
- (43) Beauchemin, R.; N'Soukpoe-Kossi, C. N.; Thomas, T. J.;
1012 Thomas, T.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H. A. Polyamine analogues
1013 bind human serum albumin. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (10), 3177–
1014 83. 1015
- (44) Dubeau, S.; Bourassa, P.; Thomas, T. J.; Tajmir-Riahi, H. A.
1016 Biogenic and synthetic polyamines bind bovine serum albumin.
1017 *Biomacromolecules* **2010**, *11* (6), 1507–15. 1018
- (45) Elsadek, B.; Kratz, F. Impact of albumin on drug delivery - New
1019 applications on the horizon. *J. Controlled Release* **2012**, *157* (1), 4–28. 1020
- (46) Kratz, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug
1021 conjugates and nanoparticles. *J. Controlled Release* **2008**, *132* (3), 171–
1022 83. 1023

Supplementary table: Sequence location of primers and probes used in RT-qPCR

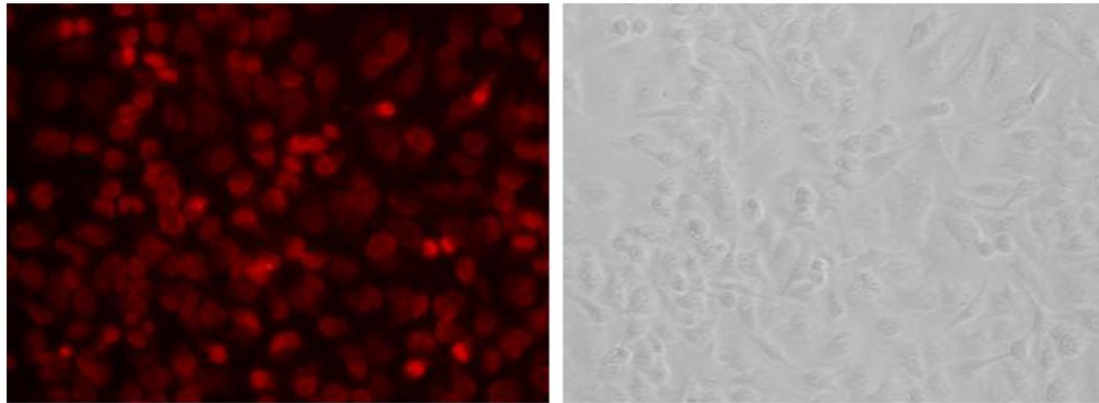
Gene	Primer	5'-3' sequences	Localisation	Position	NCBI Accession number
HPRT1 (Mus musculus)					NM013556.2
	HPRT1F	TGGTTAAGCAGTACAGCCCA	Exon6	592-612	
	HPRT1R	GGCCTGTATCCAACACTTCGAGA	Exon7	673-651	
	ZNA-HPRT1probe	FAM-CACCAGCAAGCTTGC-Z4BHQ1	Junction 6-7	641-627	
Survivin (Mus musculus)					NM009689
	SurvivinF	TCTGGCAGCTGTACCTCAAGAACT	Exon1	140-164	
	SurvivinR	AAACACTGGGCCAAATCAGGCT	Exon2	265-287	
	Survivin RT	GCCACAAAACCAAGAGAGG	Exon 4	721-702	

Supplementary figure 1: Sequence traces (www.genoscreen.fr) of the 255 bp PCR fragments amplified in the 5'RACE experiment, from samples incubated with Z₂₅-GL3 with or without serum in the cell culture medium. The sequence corresponding to GL3 siRNA is highlighted in yellow, and localizes de cleavage site.

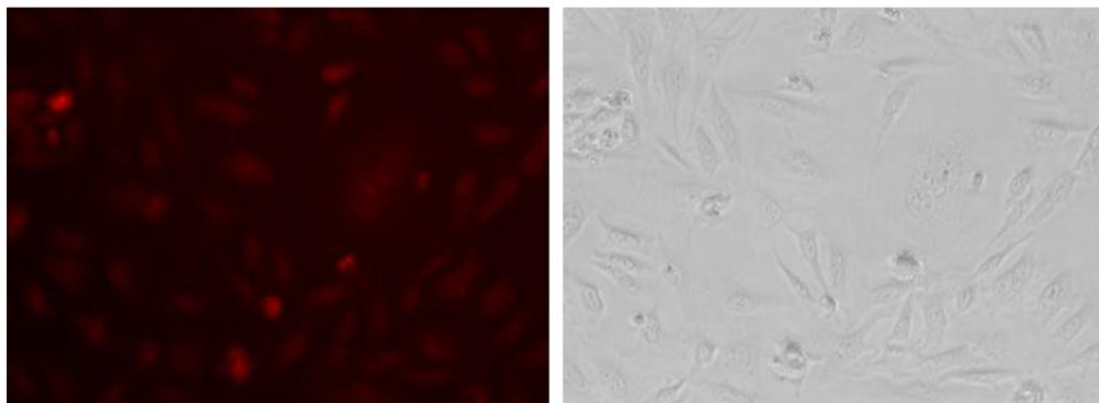


Supplementary figure 2: LaminA/C expression inhibition in HeLa cells following incubation with Z₂₅-laminA/C cationic siRNA.

Control



Z₂₅-laminA/C cationic siRNA



HeLa cells were incubated without (control) or with 150 nM Z₂₅-laminA/C in 10% serum containing medium (Sequence of lamin A/C siRNA: Sense: 5'-CUGGACUCCAGAAGAACAAdTdT-3'; Antisense: 5'-UGUUCUUCUGGAAGUCCAGdTdT-3'). 48 h post-incubation, cells were analyzed by immunocytochemistry using the following protocol. HeLa cells were fixed in 1 ml methanol for 10 min on ice, washed and incubated in goat serum (Sigma-Aldrich) diluted in 1/100 in PBS-1% BSA for 20 min on ice. Cells were then washed in PBS, and incubated on ice for 30 min with 200 µl antibody anti-laminAC (clone X67 IgG1, PROGEN-Interchim) diluted in 1/4 in PBS-1% BSA. The cells were washed and then incubated on ice for 30 min with 200 µl secondary antibody peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (SC-3738, Santa Cruz Biotech) diluted in 1/100 in PBS-1%BSA. The cells were washed and were observed in PBS by fluorescent microscopy (Nikon Eclipse TE2000-S fluorescent microscope coupled to a Nikon digital Camera).

Discussion.

Les duplexes SIRNAPLUS sont de charge globale positive ce qui leur permet d'interagir avec les syndécans chargés négativement à la surface des cellules pour être ensuite endocytés (Behr 2012). En solution les duplexes SIRNAPLUS sont supposés rester à l'état moléculaire.

La dualité de charges des conjugués ARN-oligospermine peut poser des problèmes de comportement des molécules. D'une part, il est difficile d'obtenir le brin sens cationique, en effet, nous avons rencontré de nombreuses difficultés lors des étapes de synthèse, de purification et de caractérisation. D'autre part, la formation du duplexe n'est pas si simple étant donné que le brin antisens apporte de nouvelles charges négatives au duplexe SIRNAPLUS en s'hybridant avec le brin sens cationique ce qui peut affecter la solubilité finale du duplexe.

Nous avons constaté que tous les duplexes SIRNAPLUS portant de 25 à 35 unités spermines cationiques étaient solubles lorsque les duplexes étaient formés avec des quantités équimolaires des deux brins, sens et antisens, dans l'eau. Cependant, un duplexe formé avec moins de 25 spermines commence à poser des problèmes de solubilité. C'est ce que nous avons expérimenté avec les duplexes portant 20 spermines montrant une faible solubilité dans l'eau. D'autre part, si nous mélangeons 1,5 fois plus de brin antisens que de brin sens cationique Z_{25} ou 2 fois plus avec le Z_{30} , les duplexes SIRNAPLUS précipitent. Il ressort donc de ces observations que la précipitation se produit lorsque le ratio : nombre de fonctions amines / nombre de fonctions phosphates (N/P) est de 4/3. Cette observation suggère donc que lorsque la neutralité est atteinte il y a 3 fonctions amines qui sont protonées pour 4 groupements phosphates à pH = 7. La solubilité des SIRNAPLUS est donc assurée si un excès de charges positives est présent.

Les essais *in vitro* ont permis de visualiser l'entrée des SIRNAPLUS dans les cellules. Ces observations ont apportés quelques éléments qui ont permis d'étayer l'hypothèse selon laquelle les SIRNAPLUS sont à l'état moléculaire en solution. Tout d'abord le brin antisens ne peut pas pénétrer dans la cellule lorsqu'il est mélangé avec un brin sens cationique non complémentaire, ce qui signifie que seul le duplexe formé d'un brin antisens hybridé avec son brin sens cationique complémentaire peut pénétrer dans la cellule. Ensuite, nous avons remarqué que l'addition de brin antisens au-delà du ratio 1/1 brin antisens/brin sens cationique conduisait à la précipitation du duplexe SIRNAPLUS inhibant à la fois sa pénétration cellulaire et son activité.

Le mécanisme d'entrée des SIRNAPLUS dans les cellules n'est pas connu, mais nous pensons qu'ils suivent la même voie que les polymères cationiques. Les observations de siRNAPLUS marqués avec un fluorophore nous suggèrent que ces derniers entrent dans la cellule par endocytose car ils s'accumulent sous forme vésiculaire (marquage ponctué et non diffus) et sont partiellement libérés des vésicules dans le cytoplasme, puisqu'une activité d'ARN interférence est mesurée.

Nous avons montré aussi que plus il y a de spermines greffées sur les SIRNAPLUS et plus ils s'accumulent dans les cellules. En absence de sérum, l'activité maximale est atteinte lorsque les conjugués portent 25 spermines et qu'un nombre supérieur de spermines n'améliore pas l'activité mais induit de la toxicité. En revanche, en présence de sérum, l'activité maximale est atteinte avec 30 spermines. Ceci suggère qu'il y a une légère activité d'inhibition du

sérum sur la pénétration cellulaire mais qu'elle est surpassée si le caractère cationique des molécules est augmenté.

Les duplexes cationiques SIRNAPLUS sont biologiquement actifs à des concentrations de l'ordre de 25-150 nM. Ces concentrations sont inférieures à celles utilisées pour d'autres siRNAs conjugués (cholestérol, CPP). Cependant ces concentrations restent comparables à celles utilisées dans les formulations habituelles de siRNA avec des polymères ou des lipides cationiques.

Un résultat important est celui de la démonstration du mode d'action des SIRNAPLUS par un mécanisme d'ARN interférence. Nous avons pu identifier l'ARNm coupé à la position attendue suite à l'hybridation spécifique du brin antisens sur sa cible et l'activité de RISC alors qu'une séquence non spécifique n'a pas d'effet.

Conclusion

Cette étude était dédiée à évaluer l'activité des duplexes cationiques SIRNAPLUS. Les duplexes ont été formés à partir des siRNAs standards décrit par Tuschl et ses collègues.

In vitro, les duplexes cationiques apparaissent légèrement moins actifs que les nanoparticules, cependant leur activité est conservée en présence de sérum ce qui représente un intérêt pour leur utilisation *in vivo*. En effet nous avons également montré que les duplexes SIRNAPLUS ne se dégradent pas dans du milieu de culture contenant du sérum, nous pensons que la queue polyspermine permet de protéger les duplexes des dégradations dues aux nucléases. L'augmentation de l'activité biologique peut être obtenue par l'optimisation des séquences et par l'introduction de modifications chimiques dans ces dernières.

Les duplexes siRNAPLUS sont donc potentiellement de bons candidats pour des applications *in vivo*.

D. MESURES DE LA TAILLE DES SIRNAPLUS.

Notre postulat de départ repose sur le fait que les SIRNAPLUS sont à l'état moléculaire en solution. D'autres équipes ont montré que les oligonucléotides conjugués avec du cholestérol ou des peptides cationiques ont une meilleure biodistribution que les oligonucléotides formulés avec des polymères car leur taille est beaucoup plus petite et permet une meilleure diffusion dans les tissus.

Nous avons émis l'hypothèse que les duplexes formés sont à l'état moléculaire en solution, particulièrement quand le nombre de spermines greffées est important et permet de générer des duplexes qui normalement se répulsent. Dans l'article précédent plusieurs observations sont venues étayer cette hypothèse sans réellement la prouver.

Un siRNA de 21 paires de bases fait deux tours d'hélice et mesure environ 6-7 nm de long pour environ 2 nm de diamètre. Nous pensons que les SIRNAPLUS sont un peu plus longs avec un diamètre un peu plus grand car nous pensons que la queue polyspermine se replie sur le duplexe et s'enroule autour de celui-ci suivant le petit sillon du siRNA.

Nous avons donc essayé de déterminer la taille des SIRNAPLUS et prouvé qu'en solution ils sont bien à l'état moléculaire. Pour cela, différentes techniques ont été utilisées telle que la microscopie électronique à transmission ou à force atomique et la diffusion dynamique de la lumière.

1. Diffusion dynamique de la lumière.

La diffusion dynamique de la lumière (DLS pour « Dynamic Light Scattering ») est une technique physique qui permet de déterminer la taille de petites particules en suspension. Cette technique est basée sur le fait que lorsque la lumière rencontre une particule, elle diffuse dans toutes les directions. Les particules sont constamment en mouvement en solution, ceci est dû au mouvement Brownien. En solution, les petites particules se déplacent plus rapidement que les grosses et cette vitesse de déplacement peut être corrélée avec les fluctuations de l'intensité lumineuse qu'elles diffractent au cours du temps. En effet, les fluctuations d'intensité de lumière diffractée dans le temps vont être beaucoup plus importantes pour de petites particules que pour des grosses particules.

Après le traitement mathématique qui permet une comparaison du signal obtenu avec lui-même mais légèrement décalé dans le temps, le résultat obtenu donne un rayon hydrodynamique qui représente le rayon sphérique théorique de l'objet. Lorsque la particule est chargée, la sphère hydrodynamique représente à la fois la taille de la particule et l'épaisseur de sa couche externe ionique ce qui induit une surestimation de la taille mesurée de la particule.

Nous avons donc cherché à déterminer la taille des SIRNAPLUS en utilisant cette technique de diffusion dynamique de la lumière. Les SIRNAPLUS ont été utilisés dans l'eau à une concentration 50 µg dans 400 µL. Ces conditions sont celles qui seront utilisées pour les injections *in vivo*. Les résultats des mesures effectuées montrent que les différences d'intensité de lumière diffractée au cours du temps sont trop faibles pour que les calculs qui permettent de donner une taille soient fiables. Cette constatation s'explique par les 3 raisons suivantes :

- Le constructeur prétend que l'appareil peut déterminer des tailles allant de 10 µm à 2 nm, mais nous pensons qu'avec des objets à mesurer d'environ 7 nm nous sommes à la limite de détection de l'appareil.
- Plus la taille des objets à mesurer est petite et plus leur concentration en solution doit être élevée pour pouvoir observer une différence d'intensité de lumière diffractée au cours du temps contrairement aux gros objets qui eux diffractent beaucoup plus la lumière. Dans notre cas puisque nous sommes à la limite de détection de l'appareil nous devrions travailler à des concentrations en SIRNAPLUS beaucoup plus élevées. Seulement nous pensons que si nous augmentons la concentration, nous risquons de favoriser la formation d'agrégats et donc de mesurer la taille des agrégats et non celle des molécules seules de SIRNAPLUS.
- La technique permet de donner la taille de la sphère hydrodynamique des SIRNAPLUS qui sont d'une part des entités chargées et d'autre part des entités de forme cylindrique et non sphérique. Ces approximations ne nous permettent donc pas de déterminer le plus précisément possible la taille des SIRNAPLUS.

Nous nous sommes donc tournés vers des techniques de microscopie pour pouvoir évaluer au mieux la taille des SIRNAPLUS.

2. *La microscopie électronique en transmission.*

Le principe de cette technique consiste à placer sous un faisceau d'électron un échantillon, puis par l'intermédiaire d'un système de lentilles magnétiques de projeter l'image de l'échantillon sur un écran phosphorescent qui transforme l'image électronique en image optique. Pour une meilleure visualisation, les échantillons biologiques sont métallisés avec une solution alcoolique d'acétate d'uranyle qui va venir s'accumuler dans les aspérités et sur les contours de l'échantillon. C'est l'acétate d'uranyle qui va ainsi donner une coloration négative à l'échantillon. Afin d'évaluer la taille des duplexes SIRNAPLUS nous avons donc réalisés des clichés au microscope électronique en transmission.

Nous avons observé un conjugué cationique simple brin Z₂₀-ARN₂₁ à 20 µM dans l'eau ([Figure 84 A](#)), un duplexe SIRNAPLUS Z₃₀ à 20 µM dans l'eau ([Figure 84 B](#)), une particule PEI/pCMVLuc (plasmide de 6 Kb) dans l'eau ([Figure 84 C](#)) et de l'eau seule comme contrôle ([Figure 84 D](#)). Les clichés obtenus nous montrent que dans le cas du simple brin conjugué et du duplexe SIRNAPLUS, les objets observés sont de petites tailles de l'ordre d'une dizaine de nanomètres.

En comparant les trois premiers clichés A, B et C on remarque clairement que les conjugués oligonucléotide-oligospermine sont beaucoup plus petits que les particules de PEI/ADN. On distingue aussi clairement que la forme des particules de PEI/ADN est sphérique tandis que les conjugués spermines ne le sont pas. Toutes ces observations nous permettent de prétendre que les SIRNAPLUS sont beaucoup plus petits que les formulations à base de polymères habituellement utilisées. D'autre part, l'observation des conjugués ARN-oligospermine et des SIRNAPLUS ne montrent pas la présence d'agrégats. Malgré tout, la résolution ne semble pas suffisante pour donner la taille exacte des SIRNAPLUS même s'il est certain que leur longueur est proche de la dizaine de nm.

Pour confirmer ces observations nous avons ensuite effectué d'autres observations avec une autre technique de microscopie.

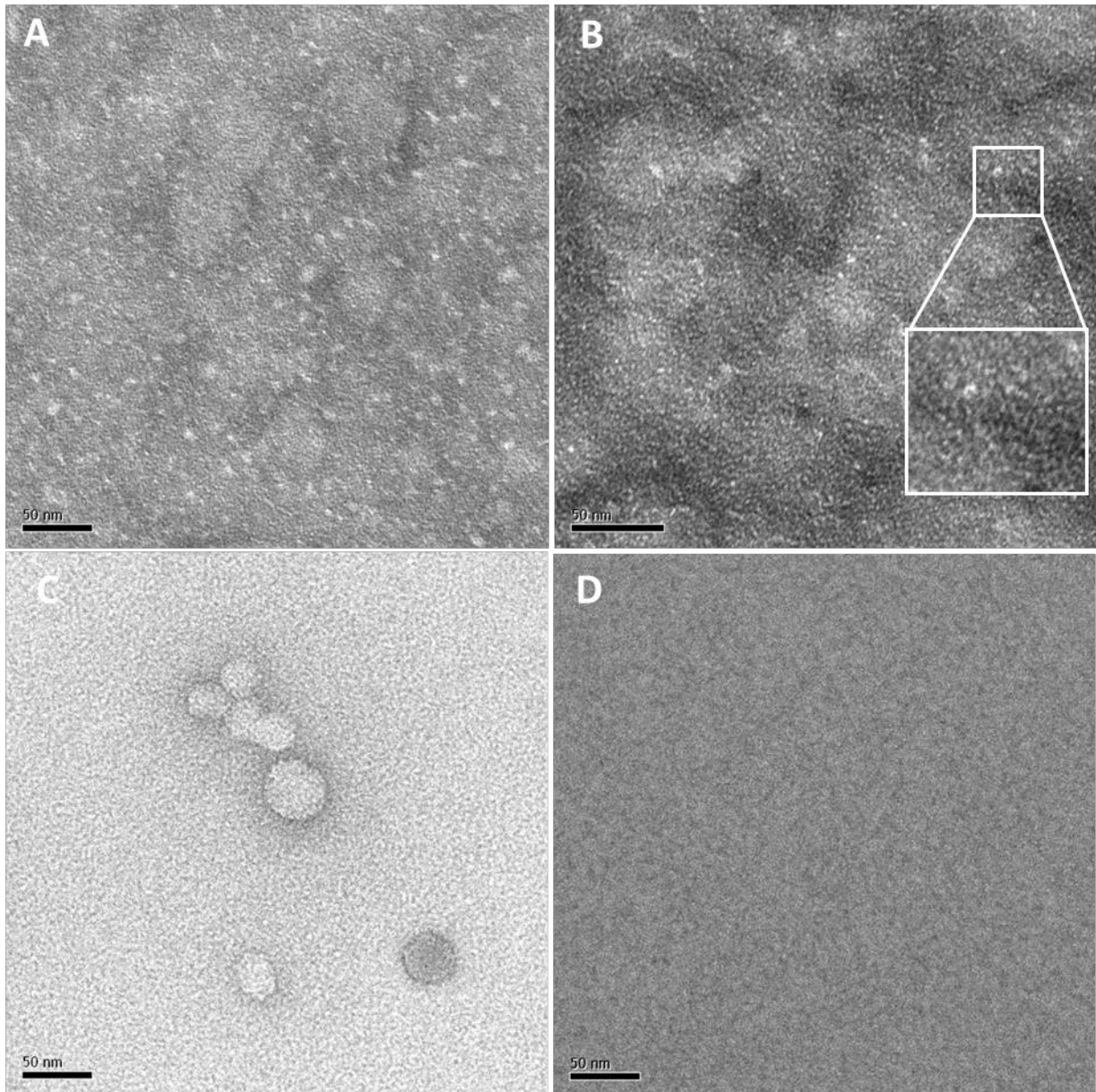


Figure 84 : Microscopie électronique en transmission (TEM pour «Transmission Electron Microscopy»). **A** : brins cationiques Z₂₀-ARN₂₁ à 20 μ M dans l'eau. **B** : Duplexe SIRNAPLUS Z₃₀. **C** : Particules de PEI/pCMVLuc à 40 μ g/400 μ L d'eau. **D** : l'eau seule comme contrôle.

3. Microscopie à force atomique.

Le principe de la microscopie à force atomique est basé sur le balayage d'une surface avec une pointe pour que cette dernière détecte les différences de relief induites par les objets présents sur la surface (surface de mica). La pointe très fine est placée à l'extrémité d'un levier dont les flexions sont détectées avec un système optique utilisant un faisceau laser. L'analyse de ces flexions permet de déterminer les interactions entre la pointe et l'échantillon. La microscopie à force atomique permet ainsi de faire la topographie de la surface de mica sur laquelle sont fixés les objets à observer.

Un des avantages de cette technique est que l'analyse des échantillons peut se faire en solution évitant ainsi le risque de formation d'agrégats comme ce peut être le cas en

microscopie électronique en transmission où les échantillons sont séchés par capillarité après avoir été déposés sur le support d'analyse.

Les différents types de forces mesurées dépendent de la variation de la distance entre la pointe et la surface analysée. C'est la raison pour laquelle, en fonction de ces trois modes découlent différents types de mesure et ainsi différentes applications.

Nos images réalisées avec cette technique ont été faites sur des duplexes SIRNAPLUS Z₃₀ à 20 µM dans l'eau. Le balayage de la surface de mica ne s'est pas fait en mode contact mais en mode « tapping ». Ce mode est le plus utilisé, il consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence de résonance. Lorsque la pointe rencontre un objet la fréquence de vibration varie. Les différences de fréquence d'oscillation sont ensuite traduites en images optiques. L'avantage du mode « tapping » est que la pointe risque moins de décrocher les petits objets de la surface de mica car elle ne vient pas racler la surface comme c'est le cas en mode contact.

Les analyses ont été faites en solution, 5 min après avoir introduit les SIRNAPLUS dans la cellule de mesure nous avons obtenu une première image ([Figure 85 A](#)). Cette image nous a révélé la présence de quelques objets mesurant de 50 à 100 nm. Le nombre d'objets observés était très faible et nous n'étions pas certains que ces objets étaient des duplexes cationiques.

Une heure et demie après avoir introduit les SIRNAPLUS en solution dans la cellule nous avons obtenu une deuxième image ([Figure 85 B](#)). Cette image nous montre beaucoup plus d'objets dont la taille est comprise entre 10-20 nm. Nous pensons que ces objets sont des duplexes SIRNAPLUS. En effet nous que pensons l'augmentation du nombre d'objets observés sur la surface de mica dans le temps est causée par le mouvement des duplexes en solution qui viennent se coller lorsque leur trajectoire croise la surface de mica. Il se produit donc une accumulation de duplexes au cours du temps sur la surface de mica.

Lorsque l'eau qui a servi à la dilution des SIRNAPLUS a été introduite seule dans la cellule, l'image de la surface de mica a montré qu'il n'y avait aucun objet présent dans l'eau qui aurait pu venir se déposer sur la surface de mica ([Figure 85 C](#)). Cette observation confirme que les objets observés sur la surface sont bien des duplexes SIRNAPLUS.

Théoriquement la longueur des duplexes SIRNAPLUS est de l'ordre d'une dizaine de nanomètres pour une épaisseur d'environ 3 nm, cependant les objets observés sur l'image B nous montre des objets mesurant entre 10 et 20 nm avec une épaisseur de 5 nm. La taille des objets observés semble être surestimée et ceci s'explique pour deux raisons. D'une part nous sommes au seuil de détection du microscope puisque sa résolution latérale est de l'ordre d'une dizaine de nanomètre. D'autre part la pointe qui balaye la surface de mica est conique et sa taille est l'ordre d'une dizaine de nanomètre. La forme cônique de la pointe vient fausser la mesure car en fait c'est l'arrête de la pointe et non son extrémité qui va venir en contact de l'objet en premier ([Figure 86](#)). La taille observée est donc surestimée par rapport à la taille réelle.

Néanmoins la microscopie à force atomique vient confirmer les observations faites en microscopie électronique en transmission, les duplexes cationique SIRNAPLUS restent à

l'état moléculaire et ne s'agrègent pas en solution. Cependant d'autres essais restent à réaliser pour vérifier qu'il ne se forme pas d'agrégats quand ils sont formulés dans les conditions prévues pour les injections *in vivo* (avec du NaCl 150 mM ou glucose 5%).

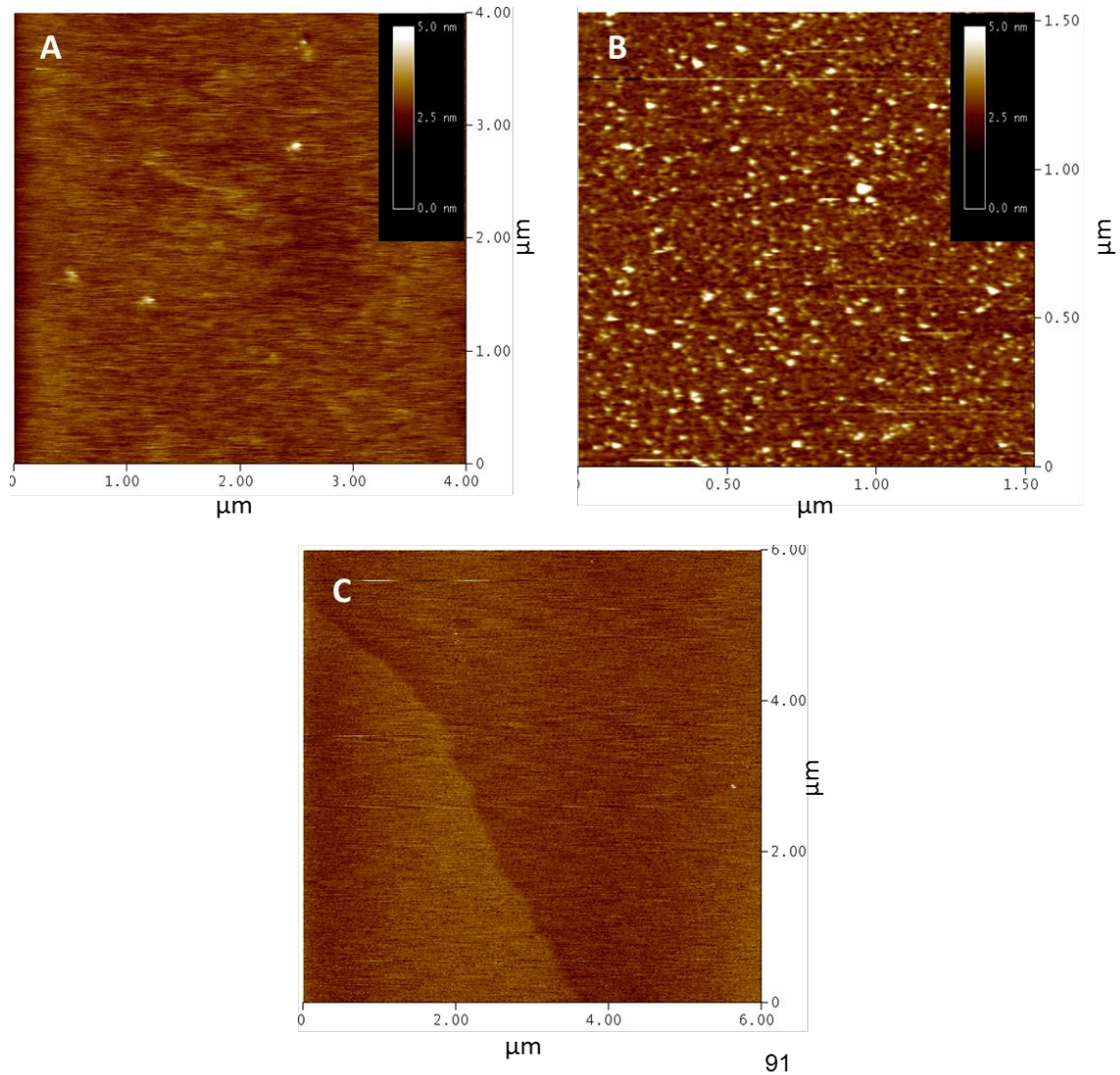


Figure 85 : Microscopie à force atomique (AFM pour « atomic force microscopy »). Duplexes cationiques Z_{30} à 20 μM dans l'eau ; A : 5 min après l'injection dans la cellule de mesure ; B : 1,5 h après l'injection dans la cellule de mesure. C : contrôle H_2O seule.

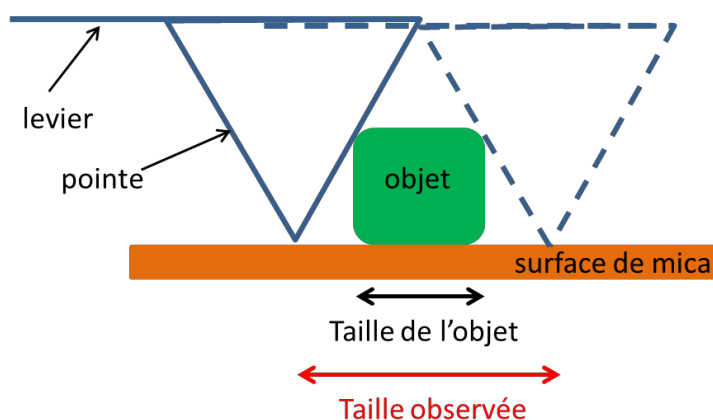


Figure 86 : Influence de la forme de la pointe sur la taille observée de l'objet.

E. ACTIVITE BIOLOGIQUE *IN VIVO*.

La principale limitation à l'utilisation de la voie ARN interférence est que les siRNAs ne peuvent être administrés nus dans l'organisme. En effet de nombreuses barrières biologiques extra et intracellulaires limitent l'utilisation des siRNAs dans le domaine thérapeutique.

Nous avons vu précédemment qu'une fois dans l'organisme les siRNA sont rapidement dégradés par les nucléases et qu'ils sont rapidement éliminés du flux sanguin lorsqu'ils sont administrés par voie systémique.

Un des premiers essais *in vivo* réalisé par les Docteurs Aline Meulle, Valérie Kedinger et Anne-Laure Bellemin a consisté à évaluer leur biodisponibilité en réalisant une étude de biodistribution.

Pour s'affranchir des éventuelles dégradations que les SIRNAPLUS peuvent subir lors d'une administration systémique, elles ont effectués des tests permettant de se concentrer sur l'évaluation de l'activité biologique en réalisant des injections locales intra-tumorales.

1. *Etude de biodistribution.*

Les SIRNAPLUS qui ont été utilisés pour ces expériences portent 30 unités spermines (Z_{30}) et les oligonucléotides siRNA contrôles ont les mêmes séquences mais ne portent pas de spermine (Z_0). Les duplexes cationiques Z_{30} et les duplexes contrôles ont été marqués avec de la Cyanine 5 (Cy5) pour pouvoir suivre leur biodistribution dans l'organisme. Les souris vivantes ont été imagées avec un appareil d'imagerie des petits animaux détectant la fluorescence dans le proche infrarouge (caliper; xenogen IVIS 100).

Les injections ont été faites en rétro-orbitale sur des souris anesthésiées avec de l'isoflurane. Les doses injectées sont de 50 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ de glucose 5% pour le duplexe cationique Z_{30} et de 100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ de glucose pour le duplexe contrôle Z_0 .

Les acquisitions des images ont été faites aux temps $t= 0$; 5'20 ; 15' ; 30' et 36' en même temps pour la souris ayant reçu les duplexes cationiques Z_{30} et la souris ayant reçu les duplexes contrôles Z_0 (Figure 87).

On remarque qu'au temps $t= 0$, les corps des souris ne montrent aucune fluorescence. Ensuite la fluorescence apparaît très nettement localisée dans les glandes salivaires et diffuse dans le reste de l'organisme de la souris contrôle 5 min 20 sec après l'injection des duplexes Z_0 . En revanche au même temps, on remarque que la fluorescence est massivement localisée dans le foie de la souris qui a reçu les duplexes cationiques Z_{30} . Cette souris ne présente pas de fluorescence diffuse dans l'organisme.

Au temps 15 minutes après l'injection, l'image de la souris qui a reçu les duplexes contrôles Z_0 montre toujours une fluorescence diffuse dans l'organisme mais le pic de fluorescence s'est déplacé au niveau de la vessie. Cela signifie que les duplexes contrôles commencent à être éliminés. L'intensité de la fluorescence au niveau du foie chez la souris ayant reçu les duplexes cationiques Z_{30} commence à diminuer mais la fluorescence ne diffuse toujours pas dans l'organisme.

Au temps 30 min après l'injection, la fluorescence est localisée dans la vessie de la souris ayant reçu les duplexes contrôles. Pour la souris ayant reçu les duplexes cationiques Z_{30} , la fluorescence est toujours localisée dans le foie mais elle commence à diminuer dans la vessie, ce qui signifie que les duplexes cationiques Z_{30} commencent à être éliminés 30 min après l'injection. On remarque que 36 min après l'injection malgré l'accumulation des duplexes cationiques Z_{30} dans la vessie il se produit une augmentation de la fluorescence au niveau du foie ce qui indique une accumulation des duplexes cationiques dans cet organe.

Les souris n'ont pas été imagées au-delà de 36 min après l'injection.

Cette étude de biodistribution nous montre clairement que les duplexes cationiques Z_{30} sont éliminés de l'organisme beaucoup moins rapidement que les duplexes contrôles Z_0 . Les duplexes cationiques sont localisés principalement dans le foie, et s'y accumulent encore environ 40 min après l'injection.

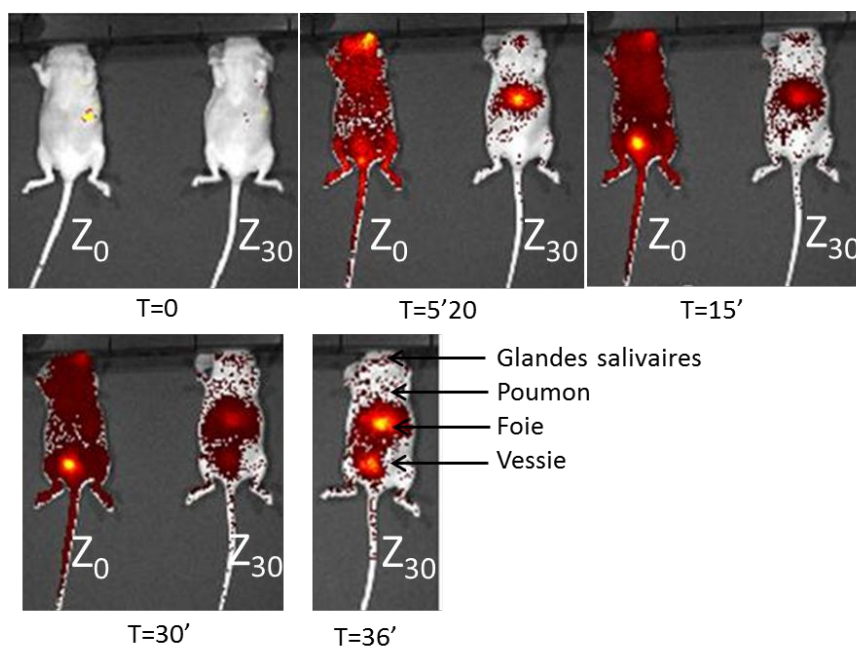


Figure 87 : Images de la biodistribution des duplexes cationiques SIRNAPLUS dans l'organisme.

2. Résultats préliminaires d'activité in vivo.

Les premiers essais permettant d'évaluer l'activité anti-tumorale des SIRNAPLUS ont été réalisés en injection locale par le Docteur Valérie Kedinger. Pour cela des cellules de mélanome murin B16-F10 ont été injectées sous la peau des souris. Le but de cet essai était d'éteindre le gène codant pour la survivine qui est une protéine inhibitrice de l'apoptose et qui entre en jeu dans le cycle cellulaire. En bloquant la production de cette protéine l'apoptose des cellules tumorales est favorisée et on bloque leur cycle cellulaire est bloqué. Ces effets cumulés permettent la prolifération tumorale.

Lors de cet essai, la régression tumorale a été évaluée au cours du temps en injectant à intervalles réguliers des SIRNAPLUS dans les tumeurs. L'efficacité des SIRNAPLUS a été évaluée en mesurant la taille des tumeurs au cours du traitement.

Des SIRNAPLUS ciblant le gène de la survivine, des duplexes contrôles négatifs ciblant un autre gène non exprimé chez la souris et le contrôle constitué de PBS seulement ont été injectés dans les tumeurs pour évaluer leur progression. Les injections dans les tumeurs ont débutés lorsque les tumeurs ont atteint des tailles de 50 mm³. Les 3 groupes de souris traitées étaient constitués de 9 souris. Les injections dans les tumeurs ont eu lieu 1 jour sur 2 jusqu'au 16^{ème} jour où les souris ont été sacrifiées. A chaque injection, 5 µg de SIRNAPLUS ont été injectés dans 50 µL de tampon phosphate salin (PBS) et dans le cas du groupe de souris contrôles, 50 µL de PBS ont été injectés.

Après 16 jours de traitement, on remarque que la progression tumorale a été inhibée d'environ 60% pour les souris traitées avec les SIRNAPLUS survivine en comparaison avec celles qui ont seulement reçu les injections de PBS (Figure 88). Cependant on remarque également que les duplexes contrôles négatifs qui ne ciblent pas le gène de la survivine ont également un léger effet aspécifique. Des essais ont été réalisés ne montrant aucune

extinction du gène cible avec une dose à 1 µg/50 µl de PBS, nous pensons qu'une des solutions envisageables pour réduire l'aspécificité serait donc d'administrer des doses comprises entre la dose actuelle à 5 µg/50 µL et la dose présentant très peu d'effet 1 µg/ 50 µl. D'autres essais restent donc à effectuer afin de trouver le bon compromis entre efficacité et aspécificité.

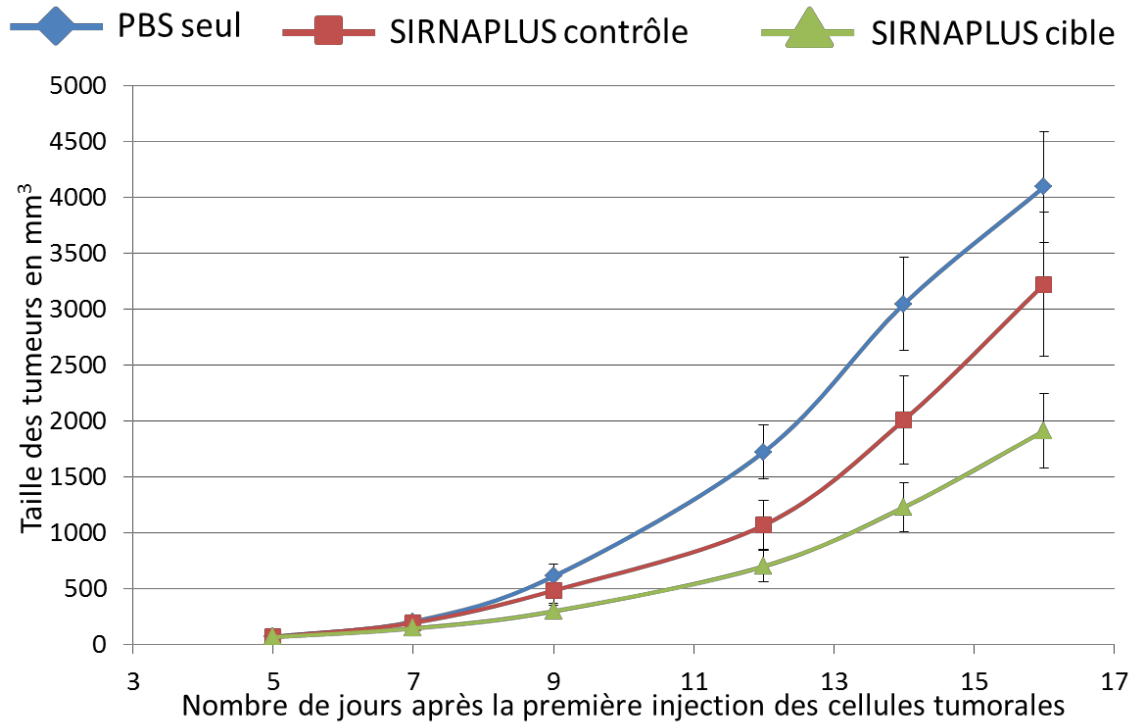


Figure 88 : Activité anti-tumorale des SIRNAPLUS. Evolution de la taille des tumeurs sous-cutanées injectées avec des SIRNAPLUS.

CONCLUSION GENERALE

Les quatre bases nucléiques codent pour l'information génétique portée par l'ADN dont la transmission est basée sur l'hybridation complémentaire des acides nucléiques. L'hybridation des acides nucléiques est la base de différentes techniques qui s'appliquent à la fois au domaine du diagnostic et à la fois au domaine de la thérapie.

Ce travail de thèse porte sur la synthèse et le développement de conjugués oligonucléotide-oligospermine qui peuvent être de charge globale, soit positive, soit négative. Les conjugués sont synthétisés sur un synthétiseur automatique d'oligonucléotides et la spermine phosphoramidite est ajoutée à l'oligonucléotide afin d'obtenir le nombre de spermines souhaité.

Dans un premier temps nous avons travaillé sur le développement des ZNAs (« Zip Nucleic Acid ») qui sont des conjugués oligonucléotide-oligospermine sur lesquels sont greffées quelques unités spermines et qui sont de charge globale négative. Ces conjugués conservent leur spécificité d'hybridation portée par la partie oligonucléotide et présentent un fort potentiel comme outils de techniques de biologie moléculaire, notamment en tant qu'amorce et sonde PCR. Nos efforts se sont concentrés sur la synthèse des ZNAs mais également sur l'évaluation de la stabilité des amorces et des sondes ZNAs en milieu basique. Les résultats de cette étude nous ont permis de mettre en évidence la fragilité en milieu basique de notre synthon C_4 spermine phosphoramidite initialement utilisé. En conséquence, nous avons synthétisé un synthon C_3 qui est plus résistant aux conditions basiques et qui pourra être utilisé dans le futur.

Les études de PCR en temps réel ont montré la grande affinité des ZNAs pour leurs séquences cibles sans que leur spécificité ne soit affectée. L'étude sur les ZNAs a également démontré que lorsque les ZNAs sont utilisés comme amorces de PCR, ils permettent de travailler à des températures d'hybridation élevées avec de faibles concentrations en amorce et en magnésium. Les amorces ZNAs ont également démontré que leur cinétique d'hybridation accrue leur permettait d'être utilisées avec des cycles de PCR beaucoup plus courts. Les études effectuées révèlent également que les amorces ZNA semblent être un outil de choix pour amplifier les régions riches en bases A et T. Les résultats indiquent que les amorces permettent d'obtenir de très bons rendements pour la réaction de transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire.

Nos études montrent que les ZNAs peuvent être très efficaces lorsqu'ils sont utilisés comme sondes d'hydrolyse, portant un fluorophore et un « quencher ». La présence des unités de

spermine sur les sondes d'hydrolyse ZNAs permet d'augmenter leur température de fusion sans affecter leur pouvoir discriminant. Les sondes d'hydrolyse que nous avons synthétisées pour ces essais portaient 4 à 5 spermines. Nous avons montré que les sondes d'hydrolyse ZNAs sont simples à utiliser et à « designer » sur la base uniquement de l'augmentation de T_m apportée par le domaine cationique. De plus, elles peuvent être utilisées dans des conditions standards de PCR. Le repliement de la queue polyspermine sur la sonde permet au « quencher » et au fluorophore de la sonde de se rapprocher dans l'espace ce qui induit une meilleure réduction du bruit de fond intrinsèque des sondes lors de la réaction de PCR.

D'autres études restent à réaliser pour déterminer les règles qui définissent le nombre adéquat de spermines à greffer sur les ZNAs, particulièrement en fonction de leurs séquences en bases. Cela permettrait de disposer d'un outil de « design » très pointu des sondes et des amorces. Ces progrès devraient permettre une utilisation plus en routine des ZNAs dans le domaine du diagnostic.

Dans un deuxième temps, nos travaux ont portés sur l'utilisation des conjugués oligonucléotide-oligospermine pour la thérapie. Nous nous sommes consacrés à démontrer le potentiel de ces conjugués dans le domaine de l'ARN interférence. Les siRNAs sont habituellement formulés à partir de polymères ou de lipides cationiques pour former des particules qui sont capables de se lier à la surface chargée négativement des cellules, pour ensuite être internalisées. La diffusion des particules dans les tissus est très faible lorsqu'elles sont administrées *in vivo*. En conséquence nous avons développé les SIRNAPLUS cationiques, contenant un conjugué ARN-oligospermine, qui sont théoriquement à l'état moléculaire en solution si leur charge globale est positive.

Les SIRNAPLUS comportent un grand nombre de spermines (environ 30 unités pour un duplexe d'environ 40 bases) de façon à changer la charge négative des duplexes de siRNA en charge globale positive. Afin d'obtenir des conjugués ARN-oligospermine les plus monodisperses indispensables pour les applications *in vitro* et *in vivo*, nous avons dû améliorer les rendements de couplage de la spermine phosphoramidite pour qu'ils atteignent 98% et qu'ils soient comparables à ceux des phosphoramidites ARNs standards. Les différents essais de déprotection des conjugués cationiques nous ont permis d'aboutir à l'utilisation d'une méthode de déprotection efficace. Nous avons également amélioré la purification des conjugués ARN-oligospermine malgré la faible résolution obtenue en IEX-HPLC pour obtenir une pureté finale proche de 85%. Les résultats des tests sur la formation des duplexes SIRNAPLUS cationiques nous montrent que leur formation est simple puisqu'il suffit d'incuber les brins sens cationiques et les brins antisens en quantités équimolaires dans l'eau pendant 30 min. Les résultats nous montrent également qu'à pH=7, il y a 3 amines sur 4 qui sont protonées. L'utilisation de SIRNAPLUS fluorescents nous a permis de montrer que leur entrée dans les cellules est en corrélation avec le nombre de spermine greffées par conjugué, plus les SIRNAPLUS sont positifs plus ils s'accumulent dans les cellules. Les tests biologiques *in vitro* montrent que les duplexes sont actifs à des concentrations comprises entre 25 et 150 nM. Ces résultats obtenus montrent que les SIRNAPLUS ne sont que

légèrement moins efficaces que les systèmes particuliers *in vitro*. L'activité des SIRNAPLUS diminue très légèrement en présence de sérum mais ils sont toujours actifs ce qui est un bon prérequis pour une utilisation *in vivo*. En outre, il apparaît que la queue polyspermine des duplexes semble protéger ces derniers vis-à-vis des dégradations induites par les nucléases. La queue cationique semble également responsable des interactions des SIRNAPLUS avec les protéines du sérum ce qui leur permet potentiellement d'améliorer leur biodisponibilité.

Les SIRNAPLUS sont théoriquement à l'état moléculaire en solution et doivent avoir une taille proche d'un siRNA non conjugué. Les observations au microscope électronique en transmission et au microscope à force atomique montrent qu'en solution les duplexes SIRNAPLUS ne forment pas d'agrégats notables et restent à l'état moléculaire. Les observations montrent que leurs tailles sont de l'ordre d'une dizaine de nanomètres.

C'est avec un certain nombre de propriétés avantageuses que nous avons initié des études *in vivo* chez la souris. Les premiers essais de biodistribution après injection par voie systémique montrent que les SIRNAPLUS sont éliminés beaucoup moins rapidement que les siRNAs ne portant pas de spermine. Les résultats indiquent une forte accumulation des SIRNAPLUS dans le foie, qui devient donc un organe cible pour de futurs essais d'activité.

Nous avons également initié la démonstration de la preuve d'activité des SIRNAPLUS dans un modèle d'injection locale, par voie intra-tumorale. Des SIRNAPLUS dirigés contre la survivine et injectés dans des xénogreffes de mélanomes induisent une inhibition significative des tumeurs. Ces premiers essais *in vivo* encourageants sont à poursuivre, notamment pour prouver le mécanisme d'action et évaluer les paramètres pharmacologiques de ces molécules. Des essais par administration systémique des SIRNAPLUS sont en cours et devraient nous permettre de définir le réel potentiel thérapeutique de cette technologie.

MATERIELS ET METHODES

A. GENERALITES.

1. *Solvants et réactif chimiques.*

Les réactifs de synthèse organique ont été fournis par la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les réactifs nécessaires à la synthèse des oligonucléotides ont été fournis par la société Glen Research (Sterling, Etats-Unis). Les solvants de synthèse ont été fournis par la société Carlo-Erba (Val de Reuil, France). Avant d'être utilisé l'acétonitrile a systématiquement été séché sur du tamis moléculaire 4 Å (Trap Pack, Bioautomation, Plano, Etats-Unis).

2. *Spectroscopie UV-visible et mesure des températures de fusion.*

Les spectres d'absorption UV-visible et les mesures de températures de fusion ont été effectués sur un spectrophotomètre Cary 100 (Varian, Les Ulis, France) équipé d'un bloc pelletier pour le contrôle des températures.

B. SYNTHÈSE AUTOMATISÉE DES CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDE-OLIGOSPERMINE.

1. *Synthèse ADN.*

Les bases ADN phosphoramidite « UltraMild », Pac-dA-CE, Ac-dC-CE, iPr-Pac-dG-CE, dT-CE sont diluées à 0,07 M avec de l'acétonitrile anhydre puis séchées avec un sachet de TrapPack (Tamis moléculaire 4 Å) pendant 2 nuits. Pour le couplage des bases ADN, les réactifs utilisés sont : Cap Mix A (THF/ Pac₂O) ; Cap Mix B (10% Melm dans THF/pyridine 8/1) ; solution oxydante (0,02 M I₂ dans du THF/pyridine/H₂O) ; Solution de déblocage (solution d'acide trichloroacétique à 3% dans du dichlorométhane). Le temps de couplage des bases ADN est de 45 secondes et 9 équivalents d'amidite sont introduits à chaque couplage.

2. *Synthèse ARN.*

Les bases ARN phosphoramidite, 5'-DMT-2'-TOM Adenosine (n-acétyl), 5'-DMT-2'-TOM Uridine, 5'-DMT-2'-TOM Guanosine (n-acétyl), 5'-DMT-2'-TOM Cytidine (n-acétyl) sont diluées à 0,07 M dans de l'acétonitrile anhydre puis séchées avec un sachet de TrapPack (Tamis moléculaire 4 Å) pendant 2 nuits. Pour le couplage des bases ARN, les réactifs utilisés sont : Cap Mix A (THF/ Pac₂O) ; Cap Mix B (10% Melm dans THF/pyridine 8/1) ; solution

oxydante (0,02 M I₂ dans du THF/pyridine/H₂O) ; Solution de déblocage (solution d'acide trichloroacétique à 3% dans du dichlorométhane). Le temps de couplage des bases ARN est de 2 min et 9 équivalents d'amidite sont introduits à chaque couplage.

3. *Synthèse oligospermine.*

La spermine phosphoramidite est diluée à 0,07 M avec de l'acétonitrile anhydre puis séchées avec un sachet de TrapPack (Tamis moléculaire 4 Å) pendant 2 nuits. Pour le couplage de spermine phosphoramidite diméthoxytrityle, les réactifs utilisés sont : Cap Mix A (THF/Pac₂O) ; Cap Mix B (10% Melm dans THF/pyridine 8/1) ; solution oxydante (0,02 M I₂ dans du THF/pyridine/H₂O) ; solution de déblocage (solution d'acide trichloroacétique à 3% dans du dichlorométhane). Le temps de couplage des spermines phosphoramidites est de 5 min et 17 équivalents d'amidite sont introduits à chaque couplage.

4. *Traitement post-synthèse.*

Pour éviter la formation d'adduits cyanoéthyles, les conjugués ADN ou ARN encore greffés sur la CPG sont traités pendant 20 min avec un flux continu de diéthylamine (DEA) à 20% dans de l'acétonitrile anhydre (environ 50 mL).

5. *Clivage du support solide.*

Pour une échelle de synthèse de conjugués ADN de 0.5 μ moles, le clivage du support solide se fait avec 500 μL d'ammoniaque concentré en même temps que la déprotection des nucléobases.

Pour une échelle de synthèse de conjugués ARN de 0.5 μ moles, le clivage du support solide se fait avec 500 μL de méthylamine aqueuse/méthylamine éthanolique 1/1 (EMAM) pendant 1 h à température ambiante. Ensuite la CPG est séparée des conjugués oligonucléotide-oligospermine en solution pour les étapes de déprotection.

6. *Déprotection et purification des conjugués ADN-oligospermine.*

La déprotection des nucléobases ADN se fait avec 500 μL d'ammoniaque concentré pendant 18 h à température ambiante (même solution que celle qui a servi au clivage des conjugués du support solide). Les conjugués ADN bruts sont ensuite directement purifiés sur cartouches de phase inverse C₁₈. Nous utilisons des colonnes Glen Pak (Glen Research, Sterling, Etats Unis) et nous suivons le protocole décrit par le fabricant pour effectuer la purification.

C. ETUDE DE STABILITE DES CONJUGUES OLIGONUCLEOTIDE-OLIGOSPERMINE.

1. Etude de stabilité des amorces PCR dans les conditions élevées de température de PCR.

Pour évaluer la stabilité des ZNAs dans les conditions drastiques de la réaction de polymérase en chaîne (résultats Figure 60 A), nous avons incubé les conjugués d'oligonucléotide modèle Z₅T₁₀ dans du Tris-EDTA (10/1 mM), pH=8 à 90°C. Pour cela le conjugué Z₅T₁₀ brut a été séparé en trois aliquots de 500 µL qui ont été incubés à 90°C dans un bain marie. Les analyses HPLC aux temps t=0, 45 min et 90 min ont été effectuées après avoir refroidis les tubes incubés durant 10 min sur de la glace.

2. Etude de stabilité des amorces PCR dans les conditions de reprise des ZNAs dans une solution d'ammoniaque à 50 mM.

Les ZNAs peuvent être difficiles à resolubiliser dans l'eau pour cela nous utilisons une solution d'ammoniaque à 50 mM pour les reprendre (résultats Figure 60 B). Pour évaluer la stabilité des ZNAs dans cette solution de reprise, nous avons incubé un conjugué d'oligonucléotide modèle Z₃T₁₀ dans de l'ammoniaque 50 mM à 90°C. Pour cela le conjugué Z₃T₁₀ brut après lyophilisation a été repris avec 1,5 mL de NH₄OH puis séparé en trois aliquots de 500 µL qui ont été incubés à 90°C au bain marie. Les analyses HPLC aux temps t=0, 45 min et 90 min ont été effectuées après avoir refroidis les tubes incubés durant 10 min sur de la glace.

3. Etude de la stabilité des amorces de PCR ZNAs dans les conditions de déprotection rapide « Ultra-Mild ».

Le conjugué ZNA modèle Z₁₀T₁₀ brut (échelle de synthèse 0,5 µmoles) a été incubé 1 h à température ambiante dans 500 µl de NH₄OH concentré pour être clivé du support solide (résultats Figure 61 A). La solution de clivage a ensuite été séparée en 5 aliquots de 100 µL. 400 µl de NH₄OH concentré ont ensuite été ajoutés à chaque aliquot de 100 µL pour obtenir un volume final par aliquot de 500 µL. Les tubes ont ensuite été incubés durant 30, 60, 300 et 390 min à 65°C. Pour les analyses, 20 µL de l'échantillon sont complétés à 100 µL d'H₂O puis sont injectés sur la colonne HPLC après que les échantillons aient été refroidis durant 10 min sur de la glace.

4. Etude de stabilité des sondes d'hydrolyse ZNAs en fonction du pH et du temps d'incubation.

Une solution stock de sonde d'hydrolyse ZNA FAM-ADN₂₂-Z₄-BHQ₁ a été séparée en 15 aliquots sur lesquels ont été ajoutés une solution de Tris 50 mM à différents pH (7,5, 8, 8,6, 9, et 10,2). Trois aliquots sont préparés pour chaque condition de pH étudié (résultats Figure 61 B). Ensuite, les aliquots ont été incubés à 65°C pendant 4 et 24 h. Les analyses des aliquots ont ensuite été effectuées sur un gel de type SDS-PAGE (cf paragraphe suivant pour la réalisation du gel SDS page).

5. Etude de stabilité du domaine oligospermine.

Le conjugué ZNA modèle Z₃T₁₀ après sa purification HPLC et lyophilisation a été repris dans 800 µL d'ammoniaque concentré puis divisé en 4 aliquots de 200 µL. Ensuite, 300 µL de NH₄OH concentré ont été ajoutés par aliquot avant d'incuber les échantillons à 65°C durant 1, 3, 5 et 7,5 h. Puis, 20 µL de chaque échantillon complétés à 100 µL d'H₂O ont été injectés sur la colonne HPLC après que les aliquots aient été préalablement refroidis durant 10 min sur de la glace (résultats Figure 64). Des analyses de masse EsiTof ont été effectuées sur les échantillons par le Dr. Jean-Marc Strub, CNRS-UNISTRA, Strasbourg (cf paragraphe suivant pour les conditions).

6. Stabilité en fonction du nombre de carbones entre le phosphate et l'amine.

Des oligonucléotides modèles T₁₀ ont été modifiés avec des motifs aminoalkyles en C₆ et C₃. Après purification HPLC et lyophilisation, les conjugués ont été repris dans 800 µL d'ammoniaque concentré puis séparés en 4 aliquots de 200 µL. Le volume des échantillons a été complété avec 300 µL de NH₄OH concentré puis les échantillons ont été incubés durant 1, 3, 5 et 7,5 h à 65°C. Pour l'analyse, 20 µL de chaque condition qsp 100 µL d'H₂O ont été injectés sur la colonne HPLC après que les échantillons aient été préalablement refroidis durant 10 min sur de la glace (résultats Figure 65).

7. Etude comparative de la stabilité de conjugués synthétisés avec la spermine phosphoramidite C₃ ou C₄.

Les conjugués ZNAs Z₈T₁₀ ont été synthétisés avec la spermine phosphoramidite C₄ et C₃. Après avoir été purifiés et lyophilisés ils ont été repris dans 600 µL d'ammoniaque concentré puis ont été divisés en trois aliquots de 200 µL chacun. Ensuite, 300 µL de NH₄OH concentré ont été ajoutés dans chacun des aliquots avant qu'ils ne soient incubés au bain marie à 65°C durant 1, 8 et 24 h. Pour l'analyse, 20 µL de chaque condition complétés avec 100 µL d'H₂O et contenant un étalon interne (20-mère thymidine pur à 95%) ont été injectés sur la colonne HPLC après que les échantillons aient été préalablement refroidis durant 10 min sur de la glace (résultats Figure 67). Le pourcentage du pic majoritaire (produit Z₈T₁₀) est rapporté à l'aire du pic de l'étalon interne pour déterminer le pourcentage de composé non dégradé.

D. DEPROTECTION ET PURIFICATION DES CONJUGUES ARN-OLIGOSPERMINE.

1. Déprotection des conjugués ARN-oligospermine.

La déprotection des conjugués ARN-oligospermine se fait en deux étapes. La première étape consiste à déprotéger les nucléobases, pour cela l'oligonucléotide est incubé une nuit à 25°C dans 500 µL d'EMAM (la même solution que celle qui a servi pour le clivage des conjugués du support solide). La solution d'EMAM est ensuite concentrée au « Speed-Vac » pendant 90 min jusqu'à obtenir environ 100 µL de solution concentrée. Ensuite on ajoute 600 µL d'H₂O RNase free (Lonza) puis on lyophilise jusqu'à obtenir un culot.

La deuxième étape consiste à déprotéger les positions 2'-OH protégées avec des groupements TOM, pour cela le culot obtenu est incubé durant une nuit dans 500 µL d'une solution de TBAF à 1 M dans du THF. Les conjugués ARN-oligospermine sont ensuite précipités avec une solution contenant 21 µL d'une solution d'acétate de sodium à 3M et 820 µL de butanol. La solution de déprotection précipitée est incubée durant 1 h à -80°C puis centrifugée durant 30 min à 12000 g à 4°C. Le surnageant est séparé du culot puis lavé deux fois avec 500 µL d'éthanol à 80% froid. Ensuite le culot est repris dans 500 µL d'H₂O RNase free puis agité vigoureusement pendant 15 min. Le culot obtenu n'est pas totalement soluble, nous centrifugeons de nouveau le tube 30 min à 14000 g à 4°C puis séparons le culot contenant les impuretés du surnageant contenant nos conjugués ([résultats de la Figure 79](#)). Le surnageant est ensuite lyophilisé pour obtenir nos conjugués ARN-oligospermine bruts.

2. *Purification des conjugués ARN-oligospermine.*

Les conjugués ARN-oligospermine sont purifiés sur colonne échangeuse d'anions sur une HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Courtaboeuf, France) munie d'un injecteur automatique et d'un collecteur automatique pour plaque 96 puits. Pour la purification, nous utilisons une colonne Dionex DNAPac PA200 9x250 mm. Les conditions utilisées sont les suivantes : éluant A : NH₄OH 0,1 M + 10% ACN ; éluant B : éluant A + 1 M NaCl ; gradient 0 à 23% de B en 23 min ; débit 2,5mL/min ; température 35°C.

E. ANALYSES HPLC DES CONJUGUES ADN-OLIGOSPERMINE ET ARN-OLIGOSPERMINE.

1. *HPLC*

Les conditions analytiques d'HPLC de nos conjugués sont identiques à celles de la purification HPLC sauf que pour l'analyse nous utilisons une colonne DNAPac PA 200 avec un diamètre inférieure : 4x250 mm. Le débit utilisé est de 1ml/min.

2. *Spectrométrie de masse Esi-Tof.*

Les spectres de masses ont été réalisés par le Dr. Jean-Marc Strub (CNRS-UNISTRA, Strasbourg) en mode ionisation négative sur un spectromètre Q-TOF (Synapt G2 HDMS, Waters, Guyancourt, France) avec un ioniseur nano-spray automatique (NanoMate, Advion, Ithaca, Etats-Unis).

3. *Spectrométrie de masse Maldi Tof*

Les spectres de masses ont été réalisés en mode ionisation positive sur un appareil Bruker Daltonics Reflex IV. La matrice utilisée est l'acide 3-hydroxypicolinique. Elle est préparée en

saturant une solution d'H₂O/acétonitrile/acide trifluoroacétique (50/50/0,5) avec de l'acide hydroxypropionique. On dépose ensuite 0,5 µl d'échantillon à analyser puis 0,5 µL de matrice puis on laisse sécher à l'air libre pour que l'échantillon co-cristallise avec la matrice.

4. Analyse des conjugués ARN-oligospermine sur gel de type SDS-PAGE.

L'analyse des conjugués cationiques simple brin se fait sur gel d'électrophorèse 12% Tris-glycine de type SDS-PAGE (gel de dépôt : 5% acryl-bisacrylamide 19 :1/SDS 0.1% ; gel de résolution, 12% acryl-bisacrylamide 19 :1/SDS 0.1%). Les échantillons sont dilués dans du tampon de charge (glycerol5%/SDS 0.1% final) avant d'être chargés sur gel. Le tampon de migration utilisé est constitué de Tris 0,025 M, glycine 0,192 M et du SDS à 0,1% final.

5. Vérification de la formation des duplexes SIRNAPLUS sur gel.

Pour contrôler la formation des duplexes nous utilisons des gels à gradient 10-20% Tris-Tricine pré-coulés fournis par Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Le tampon de migration utilisé est du Tris-Tricine 10 mM/0,01% SDS à pH 8,3.

F. MESURE DE TAILLE DES DUPLEXES SIRNAPLUS.

1. Diffusion dynamique de la lumière.

Dans le chapitre 5, je vous ai décrit les essais effectués pour tenter de déterminer la taille des duplexes SIRNAPLUS en utilisant la technique de DLS (« Dynamic Light Scattering»). La taille apparente des duplexes SIRNAPLUS a été mesurée en utilisant les paramètres suivants : temps d'acquisition de 90 s ; indice de réfraction du milieu de 1,30402 ; indice de réfraction de 1.47 ; viscosité du milieu de 1.015 ; température de 25°C. Les mesures de taille ont été effectuées avec un appareil NanoZS (Malvern Instrument, Paris, France). Ce type d'appareil, quantifie l'intensité lumineuse rétrodiffusée aux petits angles par les objets en solution, ce qui lui permet d'être très sensible tout en limitant le bruit de fond.

2. Microscopie électronique en transmission.

Les images de microscopie électronique en transmission ont été obtenues par dépôt de 5 µL d'échantillon à une concentration de 20 µM dans l'eau sur des grilles recouvertes d'une fine couche de carbone pendant 1 min, puis ajout de 30 µL d'une solution d'acétate d'uranyle à 2% pendant 1 min pour effectuer la coloration négative de l'échantillon. L'excès de liquide est ensuite retiré à l'aide d'un papier absorbant. Les grilles sont laissées pendant quelques

minutes à l'air libre pour finir de sécher. On observe ensuite les échantillons au microscope électronique (Philips EM 410).

3. *Microscopie à force atomique.*

Les duplexes SIRNAPLUS ont directement été analysés en solution à 20 μM dans l'eau. Les échantillons ont été observés dans une cellule avec un microscope à force atomique en mode « tapping » (Nanoscope III, Digital Instrument, Santa Barbara, Etats Unis). Nous avons utilisé un « cantiliver » Olympus à fine pointe (10 nm) avec une fréquence de résonance de 300 KHz avec une constante d'élasticité à 42 mN/m.

4. *Expérimentation animale.*

Les études sont réalisées en accord avec les réglementations françaises en vigueur concernant l'expérimentation animale et les protocoles utilisés ont été préalablement approuvés par le Direction des Services Vétérinaires. Les expériences ont été réalisées à la Clinique de la Souris (Illkirch, France). Des souris nude NMRI âgées de 5 semaines ont été obtenues auprès d'Élevage Janvier (Le Genset Saint Isle, France). Pour établir les xénogreffes, les cellules de melanoma murin B16-F10 cells (1×10^6 cellules dans 100 μl de milieu de culture sans serum) sont injectées dans le flanc droit sous la peau des souris. Les injections dans les tumeurs ont débutés lorsque les tumeurs ont atteint un volume moyen de 50 mm^3 . Les injections intra-tumorales ont été réalisées tous les 2 jours. A chaque injection 5 μg de SIRNAPLUS (spécifique ou non spécifique) ont été injectés dans 50 μL de tampon phosphate salin (PBS) et dans le cas du groupe de souris contrôles, 50 μl de PBS ont été injectés. Chaque groupe est constitué de 9 souris.

5. *Bio-imagerie des souris*

Pour l'étude de la biodistribution, un SIRNAPLUS modèle contenant les séquences d'un duplexe de siRNA GL3 luciférase et greffé avec 30 spermines a été utilisé. Le brin antisens GL3 luciférase a été marqué par la cyanine-5 en position 3' et il a été produit par la société Eurogentec (Liège, Belgique). Après injection des SIRNAPLUS par la voie rétro-orbitale (injection systémique), les souris sont placées dans l'appareil d'imagerie (IVIS100 xenogen, Caliper) et la fluorescence rouge émise est imagée.

ABREVIATIONS

A	Adénine
Abs	Absorbance
Ac ₂ O	Anhydride acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ago2	Argonaute 2
Apo B	Apolipoprotéine B
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
as	brin antisens
ASO	Antisens Oligonucleotide
BTT	5-benzylthio-1H-tetrazole
C	Cytosine
Conc	Concentration
CPG	Controlled pore glass (matrice de verre à taille de pore contrôlée)
CPP	Cell-penetrating peptide (peptide de pénétration cellulaire)
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
Da	Dalton
Do	Densité optique.
DCC	N, N'-dicyclohexylcarbodiimide
DMT	Diméthoxytrityle
ε	Coefficient d'extinction molaire
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique
EMAM	Méthylamine éthanolique/Méthylamine aqueuse
ESI	Ionisation électrospray
ESE	Exonic Splicing Enhancer
Ex	Exemple
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanidine
Hz	Hertz
l	Longueur du trajet optique
lcaa	Long chain alkylamino
LNA	Locked Nucleic Acid
m	Multiplet
MALDI	Ionisation désorption laser assistée par matrice
Mes	2,4,6-triméthylphényle
MET	Microscopie à transmission d'électron

Abréviations

MGB	Minor Groove binder (molécule de liaison au petit sillon)
miRNA	Micro-RNA
2'-MOE	2'- <i>O</i> -Méthoxyéthyle
MS	Spéctrométrie de masse
N	Nucléotide
n.d.	non déterminé
2'-OMe	2'- <i>O</i> -Méthyle
Pac	Phénoxyacétyle
Pac ₂ O	Anhydride phénoxyacétique
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PEI	Polyéthylèneimine
PEG	Poly (éthylèneglycol)
PMO	Morpholinos phosphorodiamidates
PNA	Peptide Nucleic Acid
Pri-miRNA	micro ARN primaire
Pre-miRNA	micro ARN précurseur
PS	Phosphorothioate
PSAM	Antigène membranaire prostatique spécifique.
QSP	Quantité Suffisante Pour
Réf.	Référence
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RLU	Relative light units
RNase	Ribonucléases
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS	Sodium Dodécyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
ss	Brin sens
SSO	Splice-switching oligonucléotide.
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyle
TCA	Acide trichloroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TFA	Trifluoroacétyle/acide trifluoroacétique
TFO	Triplex Forming Oligonucléotide
TLR	Toll-Like Receptor
TOF	Temps de vol
T _m	Température de fusion
TRBP	HIV Transactivating Response RNA-Binding Protein
Tris	Tris (hydroxyméthyl)aminoéthane.
U	Uracile
UNA	Unlocked Nucleic Acid

Abréviations

USD	United State Dollar
UV	Ultraviolet
3'-UTR	untranslated region (région non traduite de l'extrémité 3' de l'ARNm)
5'-UTR	untranslated region (région non traduite de l'extrémité 5' de l'ARNm)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ZNA	Zip Nucleic acid

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, Naoko, Hiroshi Abe, et Yoshihiro Ito. 2007. « Dumbbell-Shaped Nanocircular RNAs for RNA Interference ». *Journal of the American Chemical Society* 129 (49) (décembre 1): 15108-15109. doi:10.1021/ja0754453.
- Afonina, Irina, Maris Zivarts, Igor Kutyavin, Eugeny Lukhtanov, Howard Gamper, et Rich B. Meyer. 1997. « Efficient Priming of PCR with Short Oligonucleotides Conjugated to a Minor Groove Binder ». *Nucleic Acids Research* 25 (13) (janvier 7): 2657-2660. doi:10.1093/nar/25.13.2657.
- Agarwal, K. L., H. Büchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. Kleppe, A. Kumar, et al. 1970. « Total Synthesis of the Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast ». *Nature* 227 (5253) (juillet 4): 27-34. doi:10.1038/227027a0.
- Agrawal, S., S. H. Mayrand, P. C. Zamecnik, et T. Pederson. 1990. « Site-Specific Excision from RNA by RNase H and Mixed-Phosphate-Backbone Oligodeoxynucleotides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (4) (janvier 2): 1401-1405.
- Amarzguioui, Mohammed, Torgeir Holen, Eshrat Babaie, et Hans Prydz. 2003. « Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA ». *Nucleic acids research* 31 (2) (janvier 15): 589-595.
- Anderson, J S, et R P Parker. 1998. « The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex ». *The EMBO journal* 17 (5) (mars 2): 1497-1506. doi:10.1093/emboj/17.5.1497.
- Arora, Amit, Harleen Kaur, Jesper Wengel, et Souvik Maiti. 2008. « Effect of Locked Nucleic Acid (LNA) Modification on Hybridization Kinetics of DNA Duplex ». *Nucleic Acids Symposium Series* 52 (1) (janvier 9): 417-418. doi:10.1093/nass/nrn212.
- Bagalkot, Vaishali, et Xiaohu Gao. 2011. « siRNA-Aptamer Chimeras on Nanoparticles: Preserving Targeting Functionality for Effective Gene Silencing ». *ACS Nano* 5 (10): 8131-8139. doi:10.1021/nn202772p.
- Bartel, David P. 2004. « MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function ». *Cell* 116 (2) (janvier 23): 281-297.
- Beal, P. A., et P. B. Dervan. 1991. « Second Structural Motif for Recognition of DNA by Oligonucleotide-directed Triple-helix Formation ». *Science* 251 (4999) (mars 15): 1360-1363. doi:10.1126/science.2003222.
- Behr, Jean-Paul. 2012. « Synthetic gene transfer vectors II: back to the future ». *Accounts of chemical research* 45 (7) (juillet 17): 980-984. doi:10.1021/ar200213g.
- Bergeron, Raymond J., Jan Wiegand, James S. McManis, William R. Weimar, Richard E. Smith, Samuel E. Algee, Tammy L. Fannin, Michael A. Slusher, et Patti S. Snyder. 2001. « Polyamine Analogue Antidiarrheals: A Structure-Activity Study ». *Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2) (janvier 1): 232-244. doi:10.1021/jm000277+.
- Berner, S., K. Mühlegger, et H. Seliger. 1989. « Studies on the Role of Tetrazole in the Activation of Phosphoramidites ». *Nucleic Acids Research* 17 (3) (novembre 2): 853-864. doi:10.1093/nar/17.3.853.
- Bernstein, E, A A Caudy, S M Hammond, et G J Hannon. 2001. « Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference ». *Nature* 409 (6818) (janvier 18): 363-366. doi:10.1038/35053110.

- Bertrand, Jean-Rémi, Mireille Pottier, Antoine Vekris, Paule Opolon, Andrei Maksimenko, et Claude Malvy. 2002. « Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo ». *Biochemical and biophysical research communications* 296 (4) (août 30): 1000-1004.
- Blidner, Richard A, Robert P Hammer, Mandi J Lopez, Sandra O Robinson, et W Todd Monroe. 2007. « Fully 2'-deoxy-2'-fluoro substituted nucleic acids induce RNA interference in mammalian cell culture ». *Chemical biology & drug design* 70 (2) (août): 113-122. doi:10.1111/j.1747-0285.2007.00542.x.
- Braasch, Dwaine A, Zain Paroo, Anca Constantinescu, Gang Ren, Orhan K Oz, Ralph P Mason, et David R Corey. 2004. « Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA ». *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 14 (5) (mars 8): 1139-1143. doi:10.1016/j.bmcl.2003.12.074.
- Bramsen, Jesper B., Maria B. Laursen, Christian K. Damgaard, Suzy W. Lena, B. Ravindra Babu, Jesper Wengel, et Jørgen Kjems. 2007. « Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs ». *Nucleic Acids Research* 35 (17) (septembre): 5886-5897. doi:10.1093/nar/gkm548.
- Braunlin, W H, T J Strick, et M T Record Jr. 1982. « Equilibrium dialysis studies of polyamine binding to DNA ». *Biopolymers* 21 (7) (juillet): 1301-1314. doi:10.1002/bip.360210704.
- Broderick, J. A., et P. D. Zamore. 2011. « MicroRNA Therapeutics ». *Gene Therapy* 18 (12): 1104-1110. doi:10.1038/gt.2011.50.
- Broitman, S. L., D. D. Im, et J. R. Fresco. 1987. « Formation of the Triple-stranded Polynucleotide Helix, poly(A.A.U) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (15) (janvier 8): 5120-5124.
- Brown, Eugene L., Ramamoorthy Belagaje, Michael J. Ryan, et H. Gobind Khorana. 1979. « [8] Chemical synthesis and cloning of a tyrosine tRNA gene ». In *Recombinant DNA*, Volume 68:109-151. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687979680102>.
- Brummelkamp, Thijn R., René Bernards, et Reuven Agami. 2002. « A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells ». *Science* 296 (5567) (avril 19): 550-553. doi:10.1126/science.1068999.
- Chang, Tsung-Cheng, Duonan Yu, Yun-Sil Lee, Erik A. Wentzel, Dan E. Arking, Kristin M. West, Chi V. Dang, Andrei Thomas-Tikhonenko, et Joshua T. Mendell. 2008. « Widespread microRNA Repression by Myc Contributes to Tumorigenesis ». *Nature Genetics* 40 (1): 43-50. doi:10.1038/ng.2007.30.
- CHARGAFF, E. 1950. « Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation ». *Experientia* 6 (6) (juin 15): 201-209.
- Chen, Xiaolan, Long Shen, et Jui H Wang. 2004. « Poly-2'-DNP-RNAs with enhanced efficacy for inhibiting cancer cell growth ». *Oligonucleotides* 14 (2): 90-99. doi:10.1089/1545457041526326.
- Chendrimada, Thimmaiah P, Richard I Gregory, Easwari Kumaraswamy, Jessica Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura, et Ramin Shiekhattar. 2005. « TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing ». *Nature* 436 (7051) (août 4): 740-744. doi:10.1038/nature03868.
- Chiu, Ya-Lin, Akbar Ali, Chia-ying Chu, Hong Cao, et Tariq M. Rana. 2004. « Visualizing a Correlation between siRNA Localization, Cellular Uptake, and RNAi in Living Cells ». *Chemistry & Biology* 11 (8) (août): 1165-1175. doi:10.1016/j.chembiol.2004.06.006.

- Chiu, Ya-Lin, et Tariq M Rana. 2003. « siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis ». *RNA (New York, N.Y.)* 9 (9) (septembre): 1034-1048.
- Choung, Sorim, Young Joo Kim, Seonhoe Kim, Han-Oh Park, et Young-Chul Choi. 2006. « Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy ». *Biochemical and biophysical research communications* 342 (3) (avril 14): 919-927.
- Dande, Prasad, Thazha P. Prakash, Namir Sioufi, Hans Gaus, Russell Jarres, Andreas Berdeja, Eric E. Swayze, Richard H. Griffey, et Balkrishen Bhat. 2006. « Improving RNA Interference in Mammalian Cells by 4'-Thio-Modified Small Interfering RNA (siRNA): Effect on siRNA Activity and Nuclease Stability When Used in Combination with 2'-O-Alkyl Modifications ». *J. Med. Chem.* 49 (5): 1624-1634. doi:10.1021/jm050822c.
- Dassie, Justin P., Xiu-ying Liu, Gregory S. Thomas, Ryan M. Whitaker, Kristina W. Thiel, Katie R. Stockdale, David K. Meyerholz, Anton P. McCaffrey, James O. McNamara, et Paloma H. Giangrande. 2009. « Systemic Administration of Optimized aptamer-siRNA Chimeras Promotes Regression of PSMA-expressing Tumors ». *Nature Biotechnology* 27 (9): 839-846. doi:10.1038/nbt.1560.
- Davidson, Thomas J., Sivan Harel, Valerie A. Arboleda, Giselle F. Prunell, Michael L. Shelanski, Lloyd A. Greene, et Carol M. Troy. 2004. « Highly Efficient Small Interfering RNA Delivery to Primary Mammalian Neurons Induces MicroRNA-Like Effects Before mRNA Degradation ». *The Journal of Neuroscience* 24 (45) (octobre 11): 10040-10046. doi:10.1523/JNEUROSCI.3643-04.2004.
- Davis, Scott, Bridget Lollo, Susan Freier, et Christine Esau. 2006. « Improved Targeting of miRNA with Antisense Oligonucleotides ». *Nucleic Acids Research* 34 (8) (janvier 1): 2294-2304. doi:10.1093/nar/gkl183.
- Demidov, Vadim V., et Maxim D. Frank-Kamenetskii. 2001. « Sequence-Specific Targeting of Duplex DNA by Peptide Nucleic Acids via Triplex Strand Invasion ». *Methods* 23 (2) (février): 108-122. doi:10.1006/meth.2000.1112.
- Doan, Trung Le, Loic Perrouault, Danièle Praseuth, Nourcddine Habhoub, Jean-Luc Decout, Nguyen T. Thuong, Jean Lhomme, et Claude Héène. 1987. « Sequence-specific Recognition, Photocrosslinking and Cleavage of the DNA Double Helix by an Oligo-(α)-thymidylate Covalently Linked to an Azidoproflavine Derivative ». *Nucleic Acids Research* 15 (19) (décembre 10): 7749-7760. doi:10.1093/nar/15.19.7749.
- Dorn, Gabriele, Sadhana Patel, Glen Wotherspoon, Maja Hemmings-Mieszczak, Jane Barclay, Francois J C Natt, Pierre Martin, et al. 2004. « siRNA relieves chronic neuropathic pain ». *Nucleic acids research* 32 (5): e49. doi:10.1093/nar/gnh044.
- Dowler, Thomas, Denis Bergeron, Anna-Lisa Tedeschi, Luc Paquet, Nicolay Ferrari, et Masad J Damha. 2006. « Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA) ». *Nucleic acids research* 34 (6): 1669-1675. doi:10.1093/nar/gkl033.
- Elbashir, S M, J Harborth, W Lendeckel, A Yalcin, K Weber, et T Tuschl. 2001. « Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells ». *Nature* 411 (6836) (mai 24): 494-498. doi:10.1038/35078107.
- Elbashir, S M, W Lendeckel, et T Tuschl. 2001. « RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs ». *Genes & development* 15 (2) (janvier 15): 188-200.
- Elmén, Joacim, Håkan Thonberg, Karl Ljungberg, Miriam Frieden, Majken Westergaard, Yunhe Xu, Britta Wahren, et al. 2005. « Locked Nucleic Acid (LNA) Mediated Improvements in siRNA Stability and Functionality ». *Nucleic Acids Research* 33 (1) (janvier 1): 439-447. doi:10.1093/nar/gki193.

- Esau, Christine, Scott Davis, Susan F Murray, Xing Xian Yu, Sanjay K Pandey, Michael Pear, Lynnetta Watts, et al. 2006. « miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting ». *Cell metabolism* 3 (2) (février): 87-98. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.005.
- Felsenfeld, G., David R. Davies, et Alexander Rich. 1957. « FORMATION OF A THREE-STRANDED POLYNUCLEOTIDE MOLECULE ». *Journal of the American Chemical Society* 79 (8) (avril 1): 2023-2024. doi:10.1021/ja01565a074.
- Fire, A, S Xu, M K Montgomery, S A Kostas, S E Driver, et C C Mello. 1998. « Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* ». *Nature* 391 (6669) (février 19): 806-811. doi:10.1038/35888.
- Franklin, Rosalind E., et R. G. Gosling. 1953. « Evidence for 2-Chain Helix in Crystalline Structure of Sodium Deoxyribonucleate ». *Nature* 172 (4369) (juillet 25): 156-157. doi:10.1038/172156a0.
- Gregory, Richard I, Thimmaiah P Chendrimada, Neil Cooch, et Ramin Shiekhattar. 2005. « Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing ». *Cell* 123 (4) (novembre 18): 631-640. doi:10.1016/j.cell.2005.10.022.
- Grishok, A, H Tabara, et C C Mello. 2000. « Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans* ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5462) (mars 31): 2494-2497.
- Gu, Shuo, et John J Rossi. 2005. « Uncoupling of RNAi from active translation in mammalian cells ». *RNA (New York, N.Y.)* 11 (1) (janvier): 38-44. doi:10.1261/rna.7158605.
- Guo, S, et K J Kemphues. 1995. « par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed ». *Cell* 81 (4) (mai 19): 611-620.
- Hall, Allison H S, Jing Wan, Erin E Shaughnessy, Barbara Ramsay Shaw, et Kenneth A Alexander. 2004. « RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships ». *Nucleic acids research* 32 (20): 5991-6000. doi:10.1093/nar/gkh936.
- Hamilton, A J, et D C Baulcombe. 1999. « A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants ». *Science (New York, N.Y.)* 286 (5441) (octobre 29): 950-952.
- Harborth, Jens, Sayda M Elbashir, Kim Vandenburgh, Heiko Manninga, Stephen A Scaringe, Klaus Weber, et Thomas Tuschl. 2003. « Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing ». *Antisense & nucleic acid drug development* 13 (2) (avril): 83-105. doi:10.1089/108729003321629638.
- Hicke, Brian J., et Andrew W. Stephens. 2000. « Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy ». *Journal of Clinical Investigation* 106 (8) (octobre 15): 923-928. doi:10.1172/JCI11324.
- Holen, Torgeir, Mohammed Amarguioui, Eshrat Babaie, et Hans Prydz. 2003. « Similar Behaviour of Single-strand and Double-strand siRNAs Suggests They Act Through a Common RNAi Pathway ». *Nucleic Acids Research* 31 (9) (janvier 5): 2401-2407. doi:10.1093/nar/gkg338.
- Hoogsteen, K. 1959. « The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine ». *Acta Crystallographica* 12 (10) (octobre 10): 822-823. doi:10.1107/S0365110X59002389.
- Hornung, Veit, Margit Guenther-Biller, Carole Bourquin, Andrea Ablasser, Martin Schlee, Satoshi Uematsu, Anne Noronha, et al. 2005. « Sequence-specific potent induction of

- IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7 ». *Nature medicine* 11 (3) (mars): 263-270. doi:10.1038/nm1191.
- Hoshika, Shuichi, Noriaki Minakawa, Hiroyuki Kamiya, Hideyoshi Harashima, et Akira Matsuda. 2005. « RNA interference induced by siRNAs modified with 4'-thioribonucleosides in cultured mammalian cells ». *FEBS letters* 579 (14) (juin 6): 3115-3118. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.073.
- Hoshika, Shuichi, Noriaki Minakawa, Aki Shionoya, Keiko Imada, Naoki Ogawa, et Akira Matsuda. 2007. « Study of modification pattern-RNAi activity relationships by using siRNAs modified with 4'-thioribonucleosides ». *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 8 (17) (novembre 23): 2133-2138. doi:10.1002/cbic.200700342.
- Iwase, Reiko, Takaaki Toyama, et Kengo Nishimori. 2007. « Solid-phase synthesis of modified RNAs containing amide-linked oligoribonucleosides at their 3'-end and their application to siRNA ». *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 26 (10-12): 1451-1454. doi:10.1080/15257770701542389.
- Jakymiw, Andrew, Shangli Lian, Theophany Eystathioy, Songqing Li, Minoru Satoh, John C Hamel, Marvin J Fritzler, et Edward K L Chan. 2005. « Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference ». *Nature cell biology* 7 (12) (décembre): 1267-1274. doi:10.1038/ncb1334.
- John, Bino, Anton J Enright, Alexei Aravin, Thomas Tuschl, Chris Sander, et Debora S Marks. 2004. « Human MicroRNA Targets ». *PLoS Biol* 2 (11) (octobre 5): e363. doi:10.1371/journal.pbio.0020363.
- Juliano, Rudy, Md Rowshon Alam, Vidula Dixit, et Hyumin Kang. 2008. « Mechanisms and Strategies for Effective Delivery of Antisense and siRNA Oligonucleotides ». *Nucleic Acids Research* 36 (12) (janvier 7): 4158-4171. doi:10.1093/nar/gkn342.
- Kennerdell, Jason R, Shinji Yamaguchi, et Richard W Carthew. 2002. « RNAi is activated during Drosophila oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E ». *Genes & development* 16 (15) (août 1): 1884-1889. doi:10.1101/gad.990802.
- Khvorova, Anastasia, Angela Reynolds, et Sumedha D Jayasena. 2003. « Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias ». *Cell* 115 (2) (octobre 17): 209-216.
- Kim, Dong-Ho, Mark A. Behlke, Scott D. Rose, Mi-Sook Chang, Sangdun Choi, et John J. Rossi. 2005. « Synthetic dsRNA Dicer Substrates Enhance RNAi Potency and Efficacy ». *Nature Biotechnology* 23 (2): 222-226. doi:10.1038/nbt1051.
- Kim, Sun Hwa, Ji Hoon Jeong, Soo Hyun Lee, Sung Wan Kim, et Tae Gwan Park. 2006. « PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy ». *Journal of Controlled Release* 116 (2) (novembre 28): 123-129. doi:10.1016/j.jconrel.2006.05.023.
- Kole, R, et P Sazani. 2001. « Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing ». *Current opinion in molecular therapeutics* 3 (3) (juin): 229-234.
- Kraynack, Bryan A, et Brenda F Baker. 2006. « Small interfering RNAs containing full 2'-O-methylribonucleotide-modified sense strands display Argonaute2/eIF2C2-dependent activity ». *RNA (New York, N.Y.)* 12 (1) (janvier): 163-176. doi:10.1261/rna.2150806.
- Krützfeldt, Jan, Satoru Kuwajima, Ravi Braich, Kallanthottathil G Rajeev, John Pena, Thomas Tuschl, Muthiah Manoharan, et Markus Stoffel. 2007. « Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs ». *Nucleic acids research* 35 (9): 2885-2892. doi:10.1093/nar/gkm024.
- Krützfeldt, Jan, Nikolaus Rajewsky, Ravi Braich, Kallanthottathil G Rajeev, Thomas Tuschl, Muthiah Manoharan, et Markus Stoffel. 2005. « Silencing of microRNAs in vivo with "antagomirs" ». *Nature* 438 (7068) (décembre 1): 685-689. doi:10.1038/nature04303.

- Kumar, R, S K Singh, A A Koshkin, V K Rajwanshi, M Meldgaard, et J Wengel. 1998. « The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA ». *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8 (16) (août 18): 2219-2222.
- Kurreck, Jens, Eliza Wyszko, Clemens Gillen, et Volker A Erdmann. 2002. « Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids ». *Nucleic acids research* 30 (9) (mai 1): 1911-1918.
- Kutyavin, Igor V., Irina A. Afonina, Alan Mills, Vladimir V. Gorn, Eugeny A. Lukhtanov, Evgeniy S. Belousov, Michael J. Singer, et al. 2000. « 3'-Minor Groove Binder-DNA Probes Increase Sequence Specificity at PCR Extension Temperatures ». *Nucleic Acids Research* 28 (2) (janvier 15): 655-661. doi:10.1093/nar/28.2.655.
- Kwok, S., D. E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson, et J. J. Sninsky. 1990. « Effects of Primer-template Mismatches on the Polymerase Chain Reaction: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Model Studies ». *Nucleic Acids Research* 18 (4) (février 25): 999-1005. doi:10.1093/nar/18.4.999.
- Laursen, Maria B, Malgorzata M Pakula, Shan Gao, Kees Fluiter, Olaf R Mook, Frank Baas, Niels Langklaer, et al. 2010. « Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo ». *Molecular bioSystems* 6 (5) (mai): 862-870. doi:10.1039/b918869j.
- Layzer, Juliana M, Anton P McCaffrey, Alice K Tanner, Zan Huang, Mark A Kay, et Bruce A Sullenger. 2004. « In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs ». *RNA (New York, N.Y.)* 10 (5) (mai): 766-771.
- Lennox, Kim A, et Mark A Behlke. 2010. « A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency ». *Pharmaceutical research* 27 (9) (septembre): 1788-1799. doi:10.1007/s11095-010-0156-0.
- Letsinger, R. L., J. L. Finnan, G. A. Heavner, et W. B. Lunsford. 1975. « Nucleotide chemistry. XX. Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links ». *J. Am. Chem. Soc.* 97 (11): 3278-3279. doi:10.1021/ja00844a090.
- Letsinger, R. L., M. J. Kornet, V. Mahadevan, et D. M. Jerina. 1964. « Reactions on Polymer Supports ». *J. Am. Chem. Soc.* 86 (23): 5163-5165. doi:10.1021/ja01077a024.
- Letsinger, Robert L., et Milton J. Kornet. 1963. « Popcorn Polymer as a Support in Multistep Syntheses ». *J. Am. Chem. Soc.* 85 (19): 3045-3046. doi:10.1021/ja00902a054.
- Letsinger, Robert L., et Willie B. Lunsford. 1976. « Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates ». *J. Am. Chem. Soc.* 98 (12): 3655-3661. doi:10.1021/ja00428a045.
- Letsinger, Robert L., et Kelvin K. Ogilvie. 1969. « Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates ». *J. Am. Chem. Soc.* 91 (12): 3350-3355. doi:10.1021/ja01040a042.
- Letsinger, Robert L., Kelvin K. Ogilvie, et Paul S. Miller. 1969. « Nucleotide chemistry. XV. Developments in syntheses of oligodeoxyribonucleotides and their organic derivatives ». *J. Am. Chem. Soc.* 91 (12): 3360-3365. doi:10.1021/ja01040a044.
- Liu, Jidong, Michelle A Carmell, Fabiola V Rivas, Carolyn G Marsden, J Michael Thomson, Ji-Joon Song, Scott M Hammond, Leemor Joshua-Tor, et Gregory J Hannon. 2004. « Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5689) (septembre 3): 1437-1441. doi:10.1126/science.1102513.
- Liu, Jidong, Fabiola V. Rivas, James Wohlschlegel, John R. Yates, Roy Parker, et Gregory J. Hannon. 2005. « A Role for the P-body Component GW182 in microRNA Function ». *Nature Cell Biology* 7 (12): 1261-1266. doi:10.1038/ncb1333.

- Lohse, Jesper, Otto Dahl, et Peter E. Nielsen. 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* 96 (21) (décembre 10): 11804-11808. doi:10.1073/pnas.96.21.11804.
- Lytle, J. Robin, Therese A. Yario, et Joan A. Steitz. 2007. « Target mRNAs Are Repressed as Efficiently by microRNA-binding Sites in the 5' UTR as in the 3' UTR ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (23) (mai 6): 9667-9672. doi:10.1073/pnas.0703820104.
- Martinez, Javier, Agnieszka Patkaniowska, Henning Urlaub, Reinhard Lührmann, et Thomas Tuschl. 2002. « Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi ». *Cell* 110 (5) (septembre 6): 563-574. doi:10.1016/S0092-8674(02)00908-X.
- Matranga, Christian, Yukihide Tomari, Chanseok Shin, David P. Bartel, et Phillip D. Zamore. 2005. « Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes ». *Cell* 123 (4) (novembre 18): 607-620. doi:10.1016/j.cell.2005.08.044.
- Matsukura, M., K. Shinozuka, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J. S. Cohen, et S. Broder. 1987. « Phosphorothioate Analogs of Oligodeoxynucleotides: Inhibitors of Replication and Cytopathic Effects of Human Immunodeficiency Virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (21) (janvier 11): 7706-7710.
- Matteucci, M. D., et M. H. Caruthers. 1981. « Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support ». *J. Am. Chem. Soc.* 103 (11): 3185-3191. doi:10.1021/ja00401a041.
- McBride, L.J., et M.H. Caruthers. 1983. « An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides ». *Tetrahedron Letters* 24 (3): 245-248. doi:10.1016/S0040-4039(00)81376-3.
- McNamara, James O., Eran R. Andrechek, Yong Wang, Kristi D. Viles, Rachel E. Rempel, Eli Gilboa, Bruce A. Sullenger, et Paloma H. Giangrande. 2006. « Cell Type-specific Delivery of siRNAs with aptamer-siRNA Chimeras ». *Nature Biotechnology* 24 (8): 1005-1015. doi:10.1038/nbt1223.
- Minks, M. A., D. K. West, S. Benveniste, et C. Baglioni. 1979. « Structural Requirements of Double-stranded RNA for the Activation of 2',5'-oligo(A) Polymerase and Protein Kinase of Interferon-treated HeLa Cells. » *Journal of Biological Chemistry* 254 (20) (octobre 25): 10180-10183.
- Mook, Olaf R, Frank Baas, Marit B de Wissel, et Kees Fluiter. 2007. « Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA in vitro and in vivo ». *Molecular cancer therapeutics* 6 (3) (mars): 833-843. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0195.
- Morgan, A.R., et R.D. Wells. 1968. « Specificity of the three-stranded complex formation between double-stranded DNA and single-stranded RNA containing repeating nucleotide sequences ». *Journal of Molecular Biology* 37 (1) (octobre 14): 63-80. doi:10.1016/0022-2836(68)90073-9.
- Moschos, Sterghios Athanasios, Simon Wyn Jones, Mark Michael Perry, Andrew Evan Williams, Jonas Sten Erjefalt, John James Turner, Peter John Barnes, Brian Stephen Sproat, Michael John Gait, et Mark Andrew Lindsay. 2007. « Lung Delivery Studies Using siRNA Conjugated to TAT(48-60) and Penetratin Reveal Peptide Induced Reduction in Gene Expression and Induction of Innate Immunity ». *Bioconjugate Chem.* 18 (5): 1450-1459. doi:10.1021/bc070077d.
- Moser, H. E., et P. B. Dervan. 1987. « Sequence-specific Cleavage of Double Helical DNA by Triple Helix Formation ». *Science* 238 (4827) (octobre 30): 645-650. doi:10.1126/science.3118463.

- Muratovska, Aleksandra, et Michael R Eccles. 2004. « Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells ». *FEBS Letters* 558 (1–3) (janvier 30): 63-68. doi:10.1016/S0014-5793(03)01505-9.
- Napoli, C., C. Lemieux, et R. Jorgensen. 1990. « Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans ». *The Plant cell* 2 (4) (avril): 279-289. doi:10.1105/tpc.2.4.279.
- Ni, Xiaohua, Mark Castanares, Amarnath Mukherjee, et Shawn E. Lupold. 2011. « Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons ». *Current Medicinal Chemistry* 18 (27): 4206-4214.
- Nielsen, P, L H Dreijøe, et J Wengel. 1995. « Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing acyclic nucleosides: introduction of three novel analogues and a summary ». *Bioorganic & medicinal chemistry* 3 (1) (janvier): 19-28.
- Nielsen, Peter E, et Michael Egholm. 2001. « Strand displacement recognition of mixed adenine–cytosine sequences in double stranded DNA by thymine–Guanine PNA (Peptide nucleic acid) ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (9) (septembre): 2429-2434. doi:10.1016/S0968-0896(01)00244-9.
- Noir, Régis, Mitsuharu Kotera, Bénédicte Pons, Jean-Serge Remy, et Jean-Paul Behr. 2008. « Oligonucleotide–Oligospermine Conjugates (Zip Nucleic Acids): A Convenient Means of Finely Tuning Hybridization Temperatures ». *Journal of the American Chemical Society* 130 (40) (octobre 8): 13500-13505. doi:10.1021/ja804727a.
- Nothisen, Marc, Mitsuharu Kotera, Emilie Voirin, Jean-Serge Remy, et Jean-Paul Behr. 2009. « Cationic siRNAs provide carrier-free gene silencing in animal cells ». *Journal of the American Chemical Society* 131 (49) (décembre 16): 17730-17731. doi:10.1021/ja908017e.
- Oliveira, Sabrina, Inge van Rooy, Onno Kranenburg, Gert Storm, et Raymond M Schiffelers. 2007. « Fusogenic peptides enhance endosomal escape improving siRNA-induced silencing of oncogenes ». *International journal of pharmaceutics* 331 (2) (mars 1): 211-214. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.050.
- Ørom, Ulf Andersson, Sakari Kauppinen, et Anders H Lund. 2006. « LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function ». *Gene* 372 (mai 10): 137-141. doi:10.1016/j.gene.2005.12.031.
- Ørom, Ulf Andersson, Finn Cilius Nielsen, et Anders H. Lund. 2008. « MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation ». *Molecular Cell* 30 (4) (mai 23): 460-471. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.001.
- Place, Robert F., Long-Cheng Li, Deepa Pookot, Emily J. Noonan, et Rajvir Dahiya. 2008. « MicroRNA-373 Induces Expression of Genes with Complementary Promoter Sequences ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (5) (mai 2): 1608-1613. doi:10.1073/pnas.0707594105.
- Pons, Bénédicte, Mitsuharu Kotera, Guy Zuber, et Jean-Paul Behr. 2006. « Online synthesis of diblock cationic oligonucleotides for enhanced hybridization to their complementary sequence ». *ChemBiochem: a European journal of chemical biology* 7 (8) (août): 1173-1176. doi:10.1002/cbic.200600178.
- Potier, P, A Abdennaji, et J P Behr. 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)-2'-deoxyguanosine ». *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 6 (22) (novembre 17): 4188-4194.

- Potier, P F, et J P Behr. 2001. « Recognition of DNA by strand invasion with oligonucleotide-spermine conjugates ». *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 20 (4-7) (juillet): 809-813. doi:10.1081/NCN-100002435.
- Potier, P., A. Adib, A. Kochkine, I. Huc, et J.-P. Behr. « SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES BEARING POLYAMINE GROUPS FOR RECOGNITION OF DNA SEQUENCES ». *Nucleosides & nucleotides* 18 (6-7): 1467-1468.
- Pourceau, Gwladys, Albert Meyer, Yann Chevolut, Eliane Souteyrand, Jean-Jacques Vasseur, et François Morvan. 2010. « Oligonucleotide Carbohydrate-Centered Galactosyl Cluster Conjugates Synthesized by Click and Phosphoramidite Chemistries ». *Bioconjugate Chemistry* 21 (8) (août 18): 1520-1529. doi:10.1021/bc1001888.
- Prakash, Thazha P, Charles R Allerson, Prasad Dande, Timothy A Vickers, Namir Sioufi, Russell Jarres, Brenda F Baker, Eric E Swayze, Richard H Griffey, et Balkrishen Bhat. 2005. « Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells ». *Journal of medicinal chemistry* 48 (13) (juin 30): 4247-4253. doi:10.1021/jm050044o.
- Prakash, Thazha P, Bryan Krainack, Brenda F Baker, Eric E Swayze, et Balkrishen Bhat. 2006. « RNA interference by 2',5'-linked nucleic acid duplexes in mammalian cells ». *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16 (12) (juin 15): 3238-3240. doi:10.1016/j.bmcl.2006.03.053.
- Rand, Tim A, Sean Petersen, Fenghe Du, et Xiaodong Wang. 2005. « Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation ». *Cell* 123 (4) (novembre 18): 621-629. doi:10.1016/j.cell.2005.10.020.
- Rao, Donald D, John S Vorhies, Neil Senzer, et John Nemunaitis. 2009. « siRNA vs. shRNA: similarities and differences ». *Advanced drug delivery reviews* 61 (9) (juillet 25): 746-759. doi:10.1016/j.addr.2009.04.004.
- Romano, N, et G Macino. 1992. « Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences ». *Molecular microbiology* 6 (22) (novembre): 3343-3353.
- Saiki, R K, D H Gelfand, S Stoffel, S J Scharf, R Higuchi, G T Horn, K B Mullis, et H A Erlich. 1988. « Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase ». *Science (New York, N.Y.)* 239 (4839) (janvier 29): 487-491.
- Saiki, R K, S Scharf, F Faloona, K B Mullis, G T Horn, H A Erlich, et N Arnheim. 1985. « Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia ». *Science (New York, N.Y.)* 230 (4732) (décembre 20): 1350-1354.
- Schaller, H., G. Weimann, B. Lerch, et H. G. Khorana. 1963. « Studies on Polynucleotides. XXIV.1 The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4).2 Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3" Phosphates3 ». *J. Am. Chem. Soc.* 85 (23): 3821-3827. doi:10.1021/ja00906a021.
- Schmid, N, et J P Behr. 1991. « Location of spermine and other polyamines on DNA as revealed by photoaffinity cleavage with polyaminobenzenediazonium salts ». *Biochemistry* 30 (17) (avril 30): 4357-4361.
- Schmid, Nathalie, et Jean-Paul Behr. 1995. « Recognition of DNA sequences by strand replacement with polyamino-oligonucleotides ». *Tetrahedron Letters* 36 (9) (février 27): 1447-1450. doi:10.1016/0040-4039(95)00027-A.
- Schwarz, Dianne S, Yukihide Tomari, et Phillip D Zamore. 2004. « The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease ». *Current biology: CB* 14 (9) (mai 4): 787-791. doi:10.1016/j.cub.2004.03.008.

- Sen, George L, et Helen M Blau. 2005. « Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies ». *Nature cell biology* 7 (6) (juin): 633-636. doi:10.1038/ncb1265.
- Sen, George L, Tom S Wehrman, et Helen M Blau. 2005. « mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage ». *Differentiation; research in biological diversity* 73 (6) (juillet): 287-293. doi:10.1111/j.1432-0436.2005.00029.x.
- Siolas, Despina, Cara Lerner, Julja Burchard, Wei Ge, Peter S. Linsley, Patrick J. Paddison, Gregory J. Hannon, et Michele A. Cleary. 2005. « Synthetic shRNAs as Potent RNAi Triggers ». *Nature Biotechnology* 23 (2): 227-231. doi:10.1038/nbt1052.
- Smith, M., D. H. Rammler, I. H. Goldberg, et H. G. Khorana. 1962. « Studies on Polynucleotides. XIV.1 Specific Synthesis of the C3"-C5" Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridylyl-(3"→5")-Uridine and Uridylyl-(3"→5")-Adenosine2 ». *J. Am. Chem. Soc.* 84 (3): 430-440. doi:10.1021/ja00862a023.
- Song, Ji-Joon, Stephanie K Smith, Gregory J Hannon, et Leemor Joshua-Tor. 2004. « Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5689) (septembre 3): 1434-1437. doi:10.1126/science.1102514.
- Sontheimer, Erik J. 2005. « Assembly and function of RNA silencing complexes ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (2) (février): 127-138. doi:10.1038/nrm1568.
- Soutschek, Jürgen, Akin Akinc, Birgit Bramlage, Klaus Charisse, Rainer Constien, Mary Donoghue, Sayda Elbashir, et al. 2004. « Therapeutic Silencing of an Endogenous Gene by Systemic Administration of Modified siRNAs ». *Nature* 432 (7014) (novembre 11): 173-178. doi:10.1038/nature03121.
- Tay, Yvonne, Jinqiu Zhang, Andrew M. Thomson, Bing Lim, et Isidore Rigoutsos. 2008. « MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 Coding Regions Modulate Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Nature* 455 (7216) (septembre 17): 1124-1128. doi:10.1038/nature07299.
- Trevisan, Sara, Alberto Nonis, Maura Begheldo, Alessandro Manoli, Klaus Palme, Giovanni Caporale, Benedetto Ruperti, et Silvia Quaggiotti. 2012. « Expression and Tissue-specific Localization of Nitrate-responsive miRNAs in Roots of Maize Seedlings ». *Plant, Cell & Environment* 35 (6): 1137-1155. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02478.x.
- Voinnet, O, et D C Baulcombe. 1997. « Systemic signalling in gene silencing ». *Nature* 389 (6651) (octobre 9): 553. doi:10.1038/39215.
- Voirin, Emilie, Jean-Paul Behr, et Mitsuharu Kotera. 2007. « Versatile synthesis of oligodeoxyribonucleotide-oligospermine conjugates ». *Nature protocols* 2 (6): 1360-1367. doi:10.1038/nprot.2007.177.
- Watson, J. D., et F. H. C. Crick. 1953. « Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid ». *Nature* 171 (4356) (avril 25): 737-738. doi:10.1038/171737a0.
- Watts, Jonathan K, Niloufar Choubdar, Kashinath Sadalapure, Francis Robert, Alexander S Wahba, Jerry Pelletier, B Mario Pinto, et Masad J Damha. 2007. « 2'-fluoro-4'-thioarabino-modified oligonucleotides: conformational switches linked to siRNA activity ». *Nucleic acids research* 35 (5): 1441-1451. doi:10.1093/nar/gkl1153.
- Watts, Jonathan K, Glen F Deleavey, et Masad J Damha. 2008. « Chemically modified siRNA: tools and applications ». *Drug discovery today* 13 (19-20) (octobre): 842-855. doi:10.1016/j.drudis.2008.05.007.

- Wells, R. D., D. A. Collier, J. C. Hanvey, M. Shimizu, et F. Wohlrab. 1988. « The Chemistry and Biology of Unusual DNA Structures Adopted by Oligopurine.oligopyrimidine Sequences. » *The FASEB Journal* 2 (14) (janvier 11): 2939-2949.
- Wemmer, D E, K S Srivenugopal, B R Reid, et D R Morris. 1985. « Nuclear magnetic resonance studies of polyamine binding to a defined DNA sequence ». *Journal of molecular biology* 185 (2) (septembre 20): 457-459.
- Whitehead, Kathryn A, Robert Langer, et Daniel G Anderson. 2009. « Knocking down barriers: advances in siRNA delivery ». *Nature reviews. Drug discovery* 8 (2) (février): 129-138. doi:10.1038/nrd2742.
- Wilds, C J, et M J Damha. 2000. « 2'-Deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleosides and oligonucleotides (2'F-ANA): synthesis and physicochemical studies ». *Nucleic acids research* 28 (18) (septembre 15): 3625-3635.
- Yamada, Takeshi, Chang Geng Peng, Shigeo Matsuda, Haripriya Addepalli, K. Narayanannair Jayaprakash, Md. Rowshon Alam, Kathy Mills, et al. 2011. « Versatile Site-Specific Conjugation of Small Molecules to siRNA Using Click Chemistry ». *The Journal of Organic Chemistry* 76 (5) (mars 4): 1198-1211. doi:10.1021/jo101761g.
- Yu, Jenn-Yah, Stacy L. DeRuiter, et David L. Turner. 2002. « RNA Interference by Expression of Short-interfering RNAs and Hairpin RNAs in Mammalian Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (9) (avril 30): 6047-6052. doi:10.1073/pnas.092143499.
- Zámečník, J, L Vargová, A Homola, R Kodet, et E Syková. 2004. « Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours ». *Neuropathology and applied neurobiology* 30 (4) (août): 338-350. doi:10.1046/j.0305-1846.2003.00541.x.
- Zamecnik, P. C., et M. L. Stephenson. 1978. « Inhibition of Rous Sarcoma Virus Replication and Cell Transformation by a Specific Oligodeoxynucleotide ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 (1) (janvier 1): 280-284.
- Zamore, P D, T Tuschl, P A Sharp, et D P Bartel. 2000. « RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals ». *Cell* 101 (1) (mars 31): 25-33. doi:10.1016/S0092-8674(00)80620-0.

COMMUNICATIONS

Communications écrites :

Le 04 mai 2010, journée Campus d'Illkirch, ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN, *Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides for PCR*, Clément Paris, Valérie Moreau, Régis Noir, Gaëlle Deglane, Nathalie Lenne, Jean-Serge Remy et Patrick Erbacher.

Du 29 août au 3 septembre 2010, IRT 2010 - XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, LYON, *Characterization of oligospermine-oligonucleotide conjugates for gene silencing application*, Clément Paris, Gaëlle Deglane, Valérie Moreau, Jean-Serge Remy, Nathalie Lenne et Patrick Erbacher

Le 4 février 2011, XVIII Journée Jeunes Chercheurs, PARIS, *Oligospermine-Oligonucleotide Conjugates for Gene Silencing Applications*, Clément Paris, Gaëlle Deglane, Valérie Moreau, Jean-Serge Remy, Nathalie Lenne et Patrick Erbacher.

Clément PARIS

Développement d'oligonucléotides cationiques pour l'hybridation moléculaire et la thérapie.

Les oligonucléotides sont utilisés pour de nombreuses applications dans le domaine du diagnostic et ils peuvent également être utilisés comme traitement pour de nombreuses maladies. Les oligonucléotides sont des polyanions qui viennent s'hybrider sur leurs séquences complémentaires elles aussi anioniques. Les répulsions électrostatiques impliquent que l'addition de charges positives sur les oligonucléotides serait bénéfique pour diminuer les répulsions et améliorer l'hybridation. Dans le but de diminuer ces répulsion électrostatique des conjugués oligonucléotide-oligocation sur lesquels sont greffées des unités spermines ont été développés. Les conjugués oligonucléotide-oligocation sont synthétisés sur un synthétiseur automatique d'oligonucléotide en utilisant la chimie des phosphoramidites. Les « Zip Nucleic Acid » ou ZNAs sont des oligonucléotides portant une queue cationique de quelques unités de spermine et sont de charge globale négative. Les modifications apportées permettent d'améliorer l'hybridation en accélérant la reconnaissance de la séquence cible et en augmentant la température de fusion linéairement avec le nombre de spermines greffées sans altérer la spécificité. Les ZNAs se révèlent être efficaces utilisés comme amorces ou sondes en PCR et ils apparaissent comme de nouveaux outils intéressants pour la biologie moléculaire. Les petits ARN interférents (siRNA) induisant l'extinction d'un gène par la voie d'ARN interférence ont suscités un grand engouement ces dernières années, cependant leur très faible pénétration cellulaire est un frein majeur à leur utilisation. C'est pour cela que les conjugués oligonucléotide-oligospermine ont un réel intérêt pour le domaine de la thérapie *in vivo*. Les duplexes SIRNAPLUS cationiques sont des siRNAs ciblant spécifiquement un ARN messenger. Ils sont constitués d'un brin sens ARN-oligospermine de charge globale positive hybridé à un brin antisens. Les résultats ont montré que les SIRNAPLUS pouvaient entrer seuls dans les cellules sans agent de transfert pour induire l'extinction d'un gène cible et les premières expériences montrent qu'ils sont actifs *in vivo*. Mes travaux de thèse ont porté sur le développement des conjugués oligonucléotide-oligospermine et démontrent des applications potentielles dans le domaine du diagnostic et de la thérapie.

Mot clés : Oligonucléotides, spermine, ZNA, PCR, SIRNAPLUS, ARN interférence

Oligonucleotides are finding an extremely large number of applications in molecular diagnostics and might become a very selective class of drugs for the treatment of a vast palette of diseases. Oligonucleotides are polyanions that exert their specific activity following hybridization to a complementary sequence borne by another polyanionic nucleic acid. Simple electrostatic considerations imply that hybridization energy and cell binding could benefit from addition of cationic groups to the oligonucleotide structure. Towards the aim of improving hybridization by decreasing electrostatic repulsions between the negatively charged strands, oligonucleotide-oligocation conjugates whose global charge is modulated by the number of cationic spermine moieties grafted on the oligonucleotides have been developed. Oligonucleotide-oligospermine conjugates are produced using an automated solid-phase synthesis of conjugates that are entirely based on the phosphoramidite coupling chemistry. Zip Nucleic Acids (ZNAs) are oligonucleotides with a short polycationic tail, composed of relatively few spermine units, leading to molecules overall negative in charge. The modification improves hybridisation by accelerating the target recognition and increases the melting temperature linearly with the number of grafted spermines on the oligonucleotide without altering the specificity. ZNAs have been shown to be potent primers and probes for PCR and are new interesting tools for molecular biology and diagnostics applications. Small interfering RNA (siRNA)-mediated gene silencing has become a drug development paradigm. As drug candidates, they must also be able to cross the anionic cell membrane. However, still one major limitation of the use of siRNA remains their inability to penetrate efficiently into cells of a particular tissue or tumour. That gives to oligonucleotide-oligospermine conjugates a real interest in this domain and more generally *in vivo* therapies. Cationic SIRNAPLUS are duplexes of small RNAs targeting a specific mRNA. They are produced as an oligospermine-RNA sense strand, with positive global charge, associated to an antisense RNA strand. Results have shown that cationic siRNAs are able to enter cells efficiently without vector and to display silencing activity at nanomolar concentration. To have positive global charge, the number of spermine moieties has been increased. Purification and characterization methods have been developed to have cationic siRNAs compatible with *in vivo* experiments. My thesis will describe the synthesis of oligonucleotide-oligospermine conjugates as well as their applications.

Key words: Oligonucleotides, spermine, ZNA, PCR, SIRNAPLUS, RNA interference.

