



HAL
open science

Vectorisation d'oligonucleotides par la vitamine B2

Fanny Marlin

► **To cite this version:**

Fanny Marlin. Vectorisation d'oligonucleotides par la vitamine B2. Biologie moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA11T074 . tel-00743437

HAL Id: tel-00743437

<https://theses.hal.science/tel-00743437>

Submitted on 19 Oct 2012

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

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



Thèse de Doctorat

présentée en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université PARIS XI

Faculté de Médecine Paris-Sud

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

par

Fanny MARLIN

VECTORISATION D'OLIGONUCLEOTIDES PAR LA VITAMINE B2

Travail réalisé au sein du laboratoire de Régulation et Dynamique des Génomes
du Muséum National d'Histoire Naturelle, INSERM U565, CNRS UMR7196

Soutenue le 7 novembre 2011 devant le jury composé de:

- | | |
|---------------------------------|---------------------|
| - Dr Marie-Paule Teulade-Fichou | Rapporteur |
| - Dr Nathalie Mignet | Rapporteur |
| - Pr Claude Malvy | Examineur |
| - Pr Pascal Dumy | Examineur |
| - Dr Carine Giovannangeli | Directrice de thèse |

Sommaire

INTRODUCTION	9
1. LA STRATEGIE ANTISENS	9
1.1 Les oligonucléotides antisens	10
1.1.1 Les oligonucléotides antisens pour inhiber la traduction	11
1.1.2 Les oligonucléotides antisens pour moduler l'épissage	13
1.1.3 Les oligonucléotides antisens pour cibler les ARN non codants	15
1.1.4 Les oligonucléotides antisens de première génération	16
1.1.5 Les oligonucléotides antisens de seconde génération	17
1.1.6 Les oligonucléotides antisens de troisième génération	18
1.2 Les ribozymes et DNAzymes	23
1.3 L'ARN interférence	25
2. LA VECTORISATION DES OLIGONUCLEOTIDES	29
2.1 Barrières biologiques et nécessité de la vectorisation	29
2.1.1 Les barrières biologiques à franchir pour atteindre une cellule cible	29
2.1.2 Internalisation dans la cellule et sortie des endosomes	31
2.2 Stratégies de vectorisation des oligonucléotides	34
2.2.1 Les méthodes physiques	34
2.2.2 La vectorisation par des nanotransporteurs	35
2.2.3 La vectorisation par conjugaison chimique à un transporteur : revue	38
2.2.4 L'Internalisation Photochimique (PCI)	47
3. LA RIBOFLAVINE OU VITAMINE B2	50
3.1 Nature et rôles biologiques des flavines	50
3.2 Mécanisme d'internalisation cellulaire de la Riboflavine	51
3.3 Vectorisation par la Riboflavine	54
4. PRESENTATION DU PROJET	55
4.1 Objectif	55
4.2 Etapes du projet	55
RESULTATS	59

1. SELECTION, PROPRIETES ET ACTIVITE CELLULAIRE DES CONJUGUES FLAVINE ET LUMICHROME.....	59
1.1 Chimie des oligonucléotides antisens et des conjugués	59
1.2 Fixation à l'ARN des oligonucléotides et conjugués <i>in vitro</i>	61
1.3 Activité cellulaire des oligonucléotides et conjugués après perméabilisation	64
1.4 Mécanisme d'action des conjugués sélectionnés.....	67
1.4.1 Test de coupure par la RNase H <i>in vitro</i>	68
1.4.2 Quantification des ARNm Luciférase.....	70
1.5 Activité des conjugués sélectionnés en pénétration libre	73
1.6 Discussion	76
1.7 Conclusions	80
2. MECANISMES D'INTERNALISATION CELLULAIRE DES CONJUGUES FLAVINE ET LUMICHROME	83
2.1 Séquences des conjugués fluorescents	83
2.2 Etude de l'internalisation cellulaire de conjugués F-PNA-R et L-PNA-R : article	84
2.2.1 Résumé.....	84
2.2.2 Article	85
2.3 Internalisation cellulaire de différents conjugués fluorescents	87
2.4 Activité des double-conjugués Flavine ou Lumichrome - PNA - Rhodamine sur cellules perméabilisées.....	90
2.5 Discussion	91
2.6 Conclusions	98
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	101
1. RESUME DES RESULTATS	101
2. PERSPECTIVES.....	102
MATERIELS & METHODES.....	107
PROJET ANNEXE.....	117
1. INTRODUCTION ET PRESENTATION DU PROJET	117
2. RESULTATS	124
3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	129
4. MATERIELS & METHODES	130
BIBLIOGRAPHIE	135

Abréviations

A :	Adénine
A488 :	Alexa Fluor 488
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ApoB :	Apolipoprotéine B
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	Adénosine Triphosphate
BAC :	Bacterial Artificial Chromosome
BSA :	Bovine Serum Albumin
C :	Cytosine
CDB :	Cassure Double-Brin
CF :	Carboxyfluorescéine
CMV :	Cytomégalovirus
CPP :	Cell Penetrating Peptide
DMD :	Dystrophie Musculaire de Duchenne
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DOPC :	Dioleoyl-sn-phosphatidylcholine
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR :	Enhanced Permeability and Retention
ESE :	Exonic Splicing Enhancer
F :	Flavine
FAD :	Flavine Adénine Dinucléotide
FISH :	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FMN :	Flavine Mononucléotide
G :	Guanine

GFP :	Green Fluorescent Protein
HBSS :	Hank's Buffer Salt Solution
HER-2 :	Human Epidermal growth factor Receptor 2
hRFT :	human Riboflavin Transporter
ICAM-1 :	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN :	Interféron
k :	Lysine
L :	Lumichrome
LDL :	Low Density Lipoprotein
LNA :	Locked Nucleic Acid
Luc :	Luciférase de <i>Photinus pyralis</i>
MEM :	Minimum Essential Medium
miARN :	micro ARN
NHEJ :	Non-Homologous End Joining
NP :	N3'-P5' Phosphoroamidate
ON :	Oligonucléotide et analogue d'acides nucléiques
PAMAM :	Polyamidoamine
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCI :	Photochemical Internalization
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PEG :	Polyéthylène Glycol
PEI :	Polyéthylèneimine
PNA :	Peptide Nucleic Acid
PPT :	Polypurine Tract
pré-ARNm :	ARN pré-messager
PS :	Phosphorothioate
R :	Tétraméthylrhodamine
RCP :	Riboflavin Carrier Protein
RF :	Riboflavine
Rho-Lip :	L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)
RISC :	RNA-Induced Silencing Complex
RNase :	Ribonucléase
RT :	Rétro-Transcription
shARN :	short hairpin ARN
siARN :	small interfering ARN

SLO :	Streptolysine O
SNALP :	Stable Nucleic Acid Lipid-Particle
SUV :	Small Unilamellar Vesicles
SVF :	Sérum de Veau Foetal
T :	Thymine
TAT :	Trans-Acting Transcription activator
TBE :	Tris Borate EDTA
TLR :	Toll Like Receptor
Tm :	Température de demi-dissociation
UTR :	Untranslated Region
VEGFR :	Vascular Endothelium Growth Factor Receptor
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ZFN :	Zinc Finger Nuclease

Introduction

1. La stratégie antisens

La production d'une protéine dans la cellule résulte schématiquement de deux mécanismes successifs comportant chacun un niveau d'amplification. Le premier mécanisme correspond à la transcription, qui se déroule dans le noyau et permet la copie d'une séquence d'ADN en molécule d'ARN pré-messager (pré-ARNm) qui sera maturée en ARN messager (ARNm) après épissage. Le second mécanisme correspond à la traduction, qui se déroule dans le cytoplasme et permet la production d'une protéine dont la séquence en acides aminés est dictée par la séquence de l'ARNm.

La découverte en 1978 par Zamecnik et Stephenson qu'un oligonucléotide ADN de séquence complémentaire à un ARN viral pouvait inhiber la réplication du virus en cellules (Zamecnik and Stephenson, 1978) a apporté la première pierre à l'édifice des technologies antisens, en démontrant pour la première fois une telle activité. En parallèle, les avancées des dernières décennies ont permis d'identifier les composantes génétiques qui dirigent les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans de nombreuses pathologies humaines. Il fut alors rapidement suggéré que des molécules antisens pourraient être utilisées dans le traitement d'une multitude de maladies résultant de l'expression de gènes pathologiques, telles que les infections virales, les maladies infectieuses ou le cancer. Ces molécules antisens, capables d'inhiber l'expression d'un seul gène, se destinaient en outre à prendre une place importante en tant qu'outils de recherche pour des études fonctionnelles.

Ces applications prometteuses ont stimulé le développement de trois stratégies de type antisens reposant sur de petits acides nucléiques: les oligonucléotides antisens, les acides nucléiques catalytiques et les petits ARN interférents. Ces approches visent toutes à cibler l'ARN (pré-ARNm, ARNm ou ARN non codant) pour moduler l'expression génique.

Ce premier chapitre vise à présenter ces trois stratégies antisens en décrivant les molécules sur lesquelles elles reposent, le mécanisme impliqué, les caractéristiques spécifiques de chacune ainsi que le chemin parcouru par ces molécules sur la voie des applications thérapeutiques.

1.1 Les oligonucléotides antisens

La première description d'un oligonucléotide antisens remonte à 1978, avec l'utilisation par Zamecnik et Stephenson d'un oligodésoxyribonucléotide 13 mer complémentaire de l'ARN 35S du virus du sarcome de Rous. Sans en identifier formellement le mécanisme, les auteurs observèrent une inhibition de la réplication du virus dans des fibroblastes de poulet en culture traités par cet ON (Zamecnik and Stephenson, 1978). Depuis, le mécanisme d'action des oligonucléotides antisens a été élucidé et les oligonucléotides ADN se sont vite révélés inadaptés pour des applications thérapeutiques et fonctionnelles. En effet, malgré leur meilleure stabilité en milieu biologique que les molécules d'ARN, les courtes molécules d'ADN sont dégradées par des nucléases, principalement de type 3' exo, en quelques heures seulement en présence de sérum (Kurreck, 2008). Les dix ans qui suivirent cette découverte historique virent peu de publications paraître sur le sujet et malgré la nécessité de développer des molécules antisens avec des propriétés améliorées, celles-ci n'ont émergé qu'au début des années 90.

Il existe aujourd'hui une dizaine de chimies différentes appliquées aux ON antisens et qui sont le fruit de trois générations d'améliorations successives. Ces modifications chimiques, qui peuvent être combinées entre elles, ciblent essentiellement la position 2' du sucre et le squelette Phosphate. Les molécules antisens, incluant tout analogue d'acides nucléiques, seront ici regroupés sous le terme oligonucléotides, ou ON.

Les ON antisens, dont la taille varie en générale de 13 à 25 nucléotides (nt), sont utilisés en routine pour trois types d'applications. La première correspond à l'inhibition de l'expression d'un gène par interaction de l'ON avec l'ARNm tandis que la seconde application est unique à certains ON antisens et consiste à moduler l'épissage d'ARN pré-messagers. Enfin, une dernière application plus récente repose sur le ciblage d'ARN non codants, tels que les micro ARN (miARN), pour en inhiber les fonctions.

Nous aborderons dans cette partie les applications des ON antisens et les mécanismes impliqués. Les principaux représentants des différentes générations d'ON seront ensuite décrits en regard de leurs avantages, inconvénients et applications spécifiques.

1.1.1 Les oligonucléotides antisens pour inhiber la traduction

Les oligonucléotides antisens ont tous pour propriété d'inhiber la traduction d'un ARNm complémentaire par hybridation sur celui-ci *via* des liaisons Watson-Crick. Deux mécanismes d'action principaux ont été identifiés selon la chimie de l'ON.

Le premier, qui concerne principalement les ON de première génération ainsi que les ON ADN, fait intervenir la RNase H de type I (Walder and Walder, 1988) (Wu et al., 2004). Cette ribonucléase, ubiquitaire et localisée essentiellement dans le noyau, a un rôle essentiel dans la cellule puisqu'elle dégrade les amorces ARN synthétisées pour initier la réplication. Lorsqu'elle identifie un hétéroduplexe ARN/ADN, la RNase H clive la molécule d'ARN à proximité de son extrémité 3' au sein du duplexe (activité endonucléase) puis la dégrade de 3' vers 5' (activité exonucléase processive) tout en laissant intact le brin d'ADN. Le même phénomène se produit lorsque la RNase H reconnaît un hétéroduplexe ARNm/ON. En se fixant sur la région codante ou sur les régions 5' UTR ou 3' UTR (non traduites), les ON antisens qui activent la RNase H inhibent donc la traduction de l'ARNm en provoquant son clivage puis sa dégradation.

Trois facteurs ont été décrits comme essentiels pour permettre un clivage efficace par la RNase H d'un ARN hybridé avec un ON : la largeur du petit sillon du duplexe ARN/ON, la flexibilité de l'ON et l'accessibilité au groupe 2' OH de l'ARN (Zamaratski et al., 2001). Toute modification chimique d'un ON qui altère de manière critique l'un de ces trois paramètres, ne permet pas le clivage de l'ARN par la RNase H.

Le second mécanisme d'action concerne les ON des dernières générations dont les modifications chimiques ne permettent pas l'activation de la RNase H. Ces ON antisens agissent par blocage stérique de la traduction (Baker et al., 1997). Selon la région ciblée par l'ON antisens, différents scénarios sont suggérés pour expliquer l'inhibition de la traduction (Bennett and Swayze, 2010) :

- région de la coiffe en 5' : blocage de l'interaction du facteur d'initiation eIF4E avec l'ARNm
- région 5' UTR : blocage du balayage de la région non traduite de l'ARNm par le complexe de pré-initiation
- région du codon d'initiation : blocage de l'assemblage de la sous-unité ribosomale 60S avec la sous-unité 40S

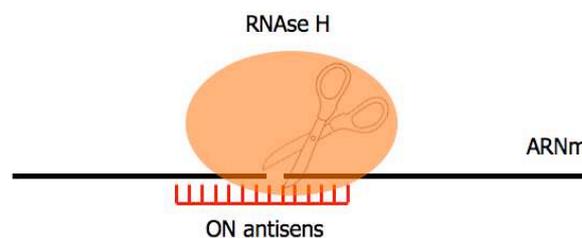
De manière générale, l'ON antisens empêche donc la fixation ou l'assemblage de la machinerie de traduction sur l'ARNm. Il a en outre été montré que certains ON antisens de type Peptide Nucleic Acid (PNA), ciblant la région codante d'un ARNm, peuvent en inhiber la

traduction *in vitro* (Knudsen and Nielsen, 1996) et en cellules (Lecosnier et al., 2011). Ceci semble possible grâce à la formation d'un complexe très stable de type triplexe PNA₂/ARN, qui induirait un blocage stérique de la progression du ribosome et donc de l'élongation de la traduction.

Il est important de remarquer que les ON bloqueurs stériques ont pour avantage, vis-à-vis des ON activant la RNase H, de minimiser le risque d'effets "off-target". En effet, la fixation d'un tel ON sur une cible secondaire ne conduira pas forcément à l'inhibition de sa traduction puisque l'ON sera sans effet sur de nombreuses régions d'un ARNm. En revanche, les bloqueurs stériques ont pour inconvénient de nécessiter des proportions au minimum stoechiométriques avec leur cible pour atteindre une efficacité maximale puisque leur mécanisme d'action n'est pas catalytique.

Les deux mécanismes d'action des ON antisens pour l'inhibition de la traduction d'un ARNm sont schématisés sur la Figure 1.1.

A) Clivage de l'ARNm par la RNase H



B) Blocage stérique de la traduction

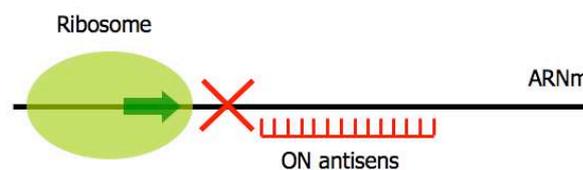


Figure 1.1 : Mécanismes d'action des ON antisens inhibant la traduction par activation de la RNase H (A) ou blocage stérique de la traduction (B)

- A) La RNase H reconnaît le duplexe ARNm/ON antisens puis dégrade l'ARNm
 B) La fixation de l'ON antisens sur l'ARNm induit un blocage stérique de la traduction

1.1.2 Les oligonucléotides antisens pour moduler l'épissage

L'épissage est l'étape qui permet de passer d'un ARN pré-messager à un ARN messager prêt à être traduit ; elle consiste à éliminer les introns et se déroule dans le noyau. C'est un processus complexe orchestré par le spliceosome et faisant intervenir des centaines de protéines et de petits ARN nucléaires (Aartsma-Rus and van Ommen, 2009). Les ON antisens n'activant pas la RNase H peuvent être utilisés pour moduler l'épissage d'un pré-ARNm par diverses approches, dont les deux principales sont présentées ci-dessous.

La première approche consiste à restaurer l'épissage correct d'un pré-ARNm muté. De nombreuses mutations responsables de maladies génétiques sont en effet à l'origine d'un épissage anormal du pré-ARNm. C'est le cas notamment pour la β -thalassémie et la mucoviscidose, où certaines mutations ponctuelles retrouvées chez les patients génèrent un site d'épissage illégitime ou cryptique, au sein d'un intron ou d'un exon (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007). Il en résulte la production d'un ARNm anormalement épissé, ayant conservé une séquence intronique ou perdu une séquence exonique, et dont la traduction génère une protéine non fonctionnelle. Le mécanisme d'action des ON correcteurs d'épissage peut être schématisé par leur fixation au niveau de la mutation, qui rend ainsi "invisible" le site d'épissage illégitime pour la machinerie d'épissage (Figure 1.2 A).

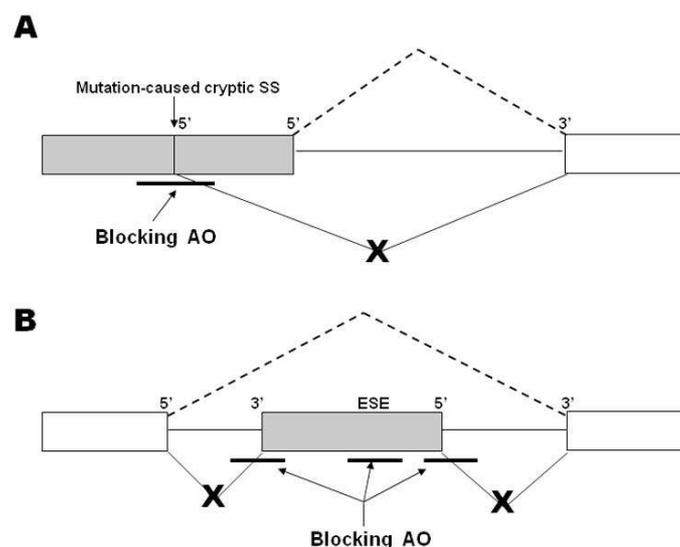


Figure 1.2 : (A) Correction d'épissage aberrant et (B) saut d'exon par un ON antisens (Du and Gatti, 2009)

Rectangle : exon, SS : site d'épissage, ESE : exonic splicing enhancer, Blocking AO : ON antisens

Une seconde application des ON antisens pour moduler l'épissage correspond au saut d'exon. Cette stratégie s'applique aux maladies génétiques provoquées par une mutation interrompant le cadre de lecture, générant ainsi une protéine tronquée non fonctionnelle. Elle consiste à diriger un ON contre l'exon portant le codon STOP prématuré afin de provoquer son épissage, et ainsi restaurer le cadre lecture. L'ON peut provoquer le saut d'exon en se fixant sur le pré-ARNm au niveau de la jonction intron/exon ou sur la région ESE (exonic splicing enhancer) (Figure 1.2 B).

Un nombre important de travaux ont été menés sur l'utilisation du saut d'exon dans le contexte de la Dystrophie Musculaire de Duchenne ou DMD. Cette maladie est provoquée par des mutations dans le gène *DMD* qui abolissent la production de dystrophine fonctionnelle, une protéine nécessaire à la stabilité des fibres musculaires durant leur contraction (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007). Lorsque le défaut de dystrophine est dû à une interruption prématurée du cadre de lecture, la production d'une protéine raccourcie mais partiellement fonctionnelle peut être restaurée par saut d'exon (Figure 1.3).

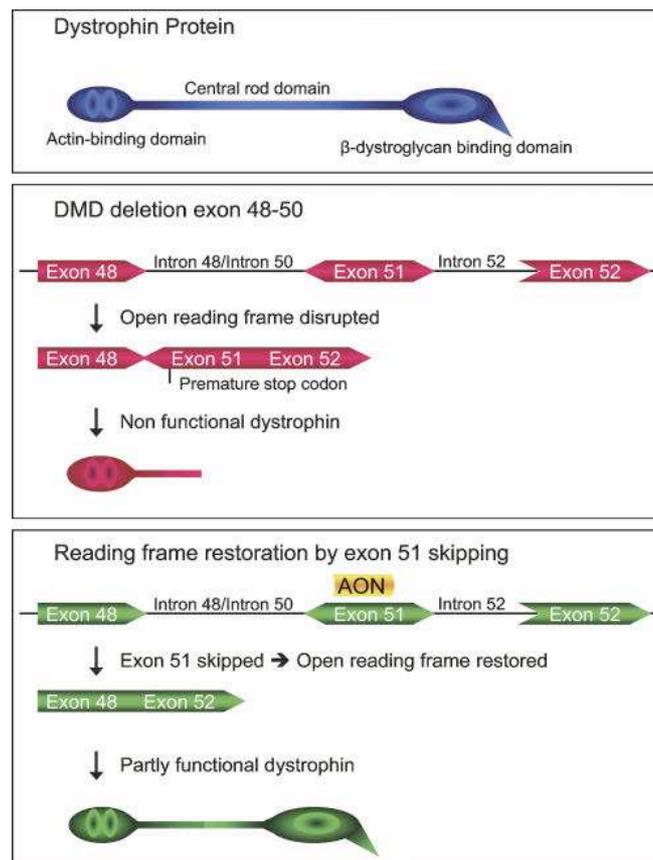


Figure 1.3 : Saut d'exon par un ON antisens (AON) dans le contexte de la Dystrophie musculaire de Duchenne (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007)

Cadre bleu : individu sain, cadre rouge : individu atteint de DMD suite à la délétion des exons 48 à 50, cadre vert : restauration du cadre de lecture et production d'une protéine dystrophine partiellement fonctionnelle par saut d'exon induit par un ON antisens

1.1.3 Les oligonucléotides antisens pour cibler les ARN non codants

Les micro ARN (miARN) sont de petits ARN endogènes non codants qui assurent des fonctions de régulation génique post-transcriptionnelle. Initialement mis à jour chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, plusieurs centaines de miARN ont été identifiés à ce jour chez l'Homme (Esau and Monia, 2007). Les pré-miARN sont principalement transcrits à partir de régions intergéniques et sont ensuite exportés dans le cytoplasme où ils sont maturés en duplexes de 19 à 25nt par la ribonucléase Dicer. Les miARN matures sont ensuite pris en charge par le complexe multi-protéique RISC (RNA-induced silencing complex) qui sépare les deux brins du duplexe et dégrade l'un d'entre eux. Le miARN chargé sur le complexe RISC peut alors s'hybrider sur la région 3'UTR d'un ARNm partiellement complémentaire, et conduire à l'inhibition de la traduction du messenger en provoquant sa séquestration dans les "P-bodies" où celui-ci serait dégradé (Figure 1.4). Il a été établi qu'une complémentarité de 6nt entre l'ARNm et la région 5' du miARN serait suffisante pour induire une inhibition de la traduction, un même miARN pouvant donc potentiellement réguler la traduction de plusieurs centaines d'ARNm (Esau and Monia, 2007).

Plus rarement, dans le cas d'une complémentarité totale avec l'ARNm, le miARN peut provoquer la dégradation du messenger par un mécanisme de type ARN interférence (voir paragraphe 1.3).

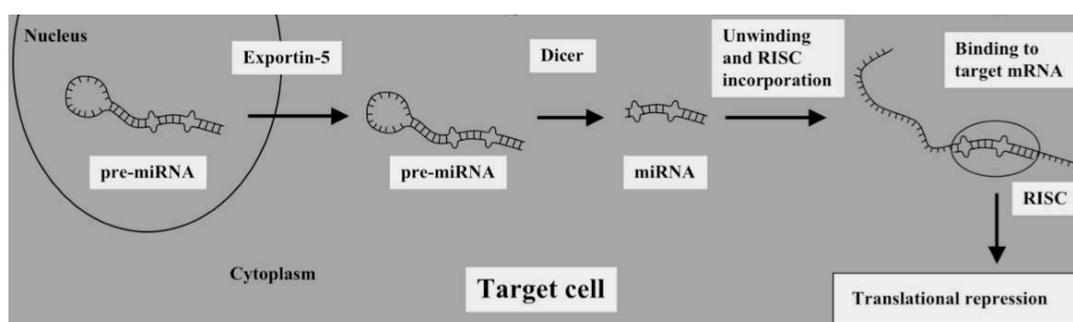


Figure 1.4 : Mécanisme de répression traductionnelle par les miARN (Aigner, 2008)

Le pré-miARN est synthétisé dans le noyau puis exporté dans le cytoplasme où il est maturé par Dicer et chargé dans le complexe RISC. Le miARN peut alors s'hybrider sur un ARNm partiellement complémentaire, et provoquer l'inhibition de la traduction du messenger.

Les miARN réguleraient ainsi la traduction d'environ 30% des ARNm. Même si leurs fonctions biologiques restent assez méconnues, les miARN seraient impliqués dans de

nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies métaboliques ou encore les infections virales, et constituent donc une nouvelle cible thérapeutique (Esau and Monia, 2007).

Une dernière application pour laquelle les ON antisens peuvent être utilisés consiste donc à cibler les miARN pour en abolir les fonctions biologiques, en provoquant leur dégradation (ON induisant un clivage par la RNase H) ou leur séquestration (ON n'activant pas la RNase H). Par hybridation complémentaire sur un miARN, un ON peut ainsi empêcher celui-ci d'interagir avec sa cible et donc lever l'inhibition de la traduction induite par le miARN.

1.1.4 Les oligonucléotides antisens de première génération

La première génération d'ON antisens modifiés chimiquement correspond aux Phosphorothioates (PS), au sein desquels l'atome d'Oxygène engagé dans une simple liaison avec le Phosphate est remplacé par un atome de Soufre (Figure 1.5).

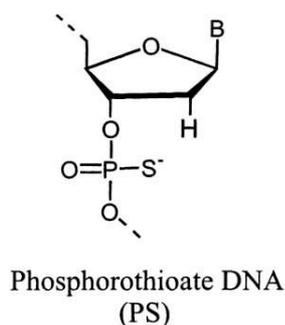


Figure 1.5 : Chimie des oligonucléotides antisens Phosphorothioate

La synthèse d'ON PS fut décrite pour la première fois en 1969 (De Clercq et al., 1969) et c'est à ce jour la classe d'ON qui a été la plus étudiée. En dépit de ces modifications chimiques, le duplexe formé par un ON PS et un ARN complémentaire permet la dégradation de l'ARN par la RNase H. Vis-à-vis de leurs analogues Phosphodiester, les PS possèdent une plus grande résistance à la dégradation par les nucléases, avec un temps de demi-vie dans le sérum humain multiplié environ par dix (Kurreck, 2003).

Les ON PS possèdent cependant quelques inconvénients tels qu'une affinité amoindrie pour leur cible et la capacité, à concentration élevée, d'interagir de manière non spécifique avec les protéines. Ces interactions aspécifiques peuvent potentiellement engendrer des effets secondaires associés à une toxicité. Il a par exemple été montré que les ON PS peuvent inhiber

certaines ADN polymérase et la RNase H (Gao et al., 1992) et interagir avec certains récepteurs membranaires tels qu'EGFR (epidermal growth factor receptor) et VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), inhibant ainsi la fixation de leurs ligands respectifs (Rockwell et al., 1997). En outre, des études ont montré que les ON PS interagissent avec des protéines du sérum telles que la protéine de liaison à l'héparine, l'albumine ou encore la thrombine. Ces interactions non spécifiques ont cependant un impact positif sur la pharmacocinétique des PS, puisqu'elles contribuent à augmenter leur temps de demi-vie dans le sérum (Kurreck, 2008).

La première utilisation des PS en tant que molécule antisens remonte à une étude de 1987 sur l'inhibition de la réplication du VIH (Matsukura et al., 1987). De nombreux travaux ont été menés depuis, conduisant cette classe de molécules jusqu'en essais cliniques et même à la mise sur le marché. En 1998, le Vitravene (ISIS/Novartis) fut en effet le premier ON antisens autorisé sur le marché, dans le but de traiter les rétinites induites par le CMV (cytomégalovirus) en injection locale. L'utilisation de ce premier médicament issu de la stratégie antisens reste néanmoins limitée, du fait de son champ d'application restreint et de son mode d'administration.

Malgré l'abandon de certains essais pour cause de toxicité ou d'inefficacité, une dizaine d'ON PS dirigés principalement contre des cibles impliquées dans le cancer seraient encore en essais cliniques actuellement (Rayburn and Zhang, 2008).

1.1.5 Les oligonucléotides antisens de seconde génération

La seconde génération d'ON antisens est essentiellement constituée des 2'-O-méthyl et 2'-O-méthoxyéthyl ribonucléotides, qui possèdent un groupe méthyl ou méthoxyéthyl en position 2' du ribose (Figure 1.6).

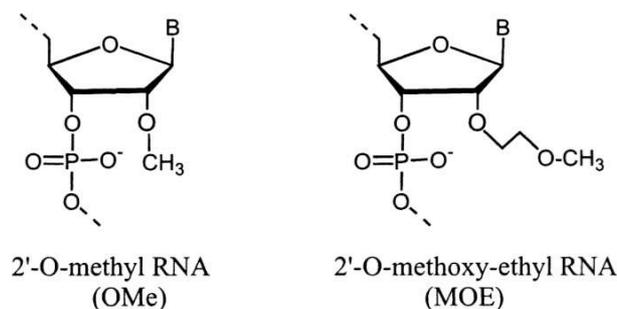


Figure 1.6 : Chimies des oligonucléotides antisens de deuxième génération

Ces molécules ont été développées pour résoudre certains problèmes posés par les PS et sont notamment plus affines pour leur cible et moins toxiques que leurs prédécesseurs. Contrairement aux modifications chimiques des ON de première génération, les groupements methyl ou alkyl présents en 2' du ribose ne permettent pas l'activation de la RNase H (Kurreck, 2003).

Les ON 2'-O-methyl et methoxyethyl sont donc les premiers ON antisens à avoir été utilisés pour la modulation de l'épissage. Pour la première fois en 1993 puis en 1996, un ON 2'-O-methyl a effectivement été utilisé pour corriger l'épissage aberrant d'un pré-ARNm muté de la β -globine *in vitro* (Dominski and Kole, 1993) puis en cellules (Sierakowska et al., 1996).

En parallèle, des ON 2'-O-methoxyethyl ont également été utilisés pour la première fois en tant que bloqueurs stériques de la traduction. Il a en effet été montré qu'un tel ON ciblant la région de la coiffe en 5' de l'ARNm d'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) pouvait inhiber la traduction de sa cible en cellules, vraisemblablement en interférant avec la formation du complexe d'initiation de la traduction (Baker et al., 1997).

Deuxième classe d'ON antisens la plus étudiée derrière les PS, une quinzaine d'ON de seconde génération seraient actuellement en phase I ou II d'essais cliniques.

1.1.6 Les oligonucléotides antisens de troisième génération

Les principales chimies d'ON antisens de troisième génération qui seront présentées sont les N3'-P5' Phosphoroamidates, les Locked Nucleic Acids, les Morpholinos et les Peptide Nucleic Acids (Figure 1.7).

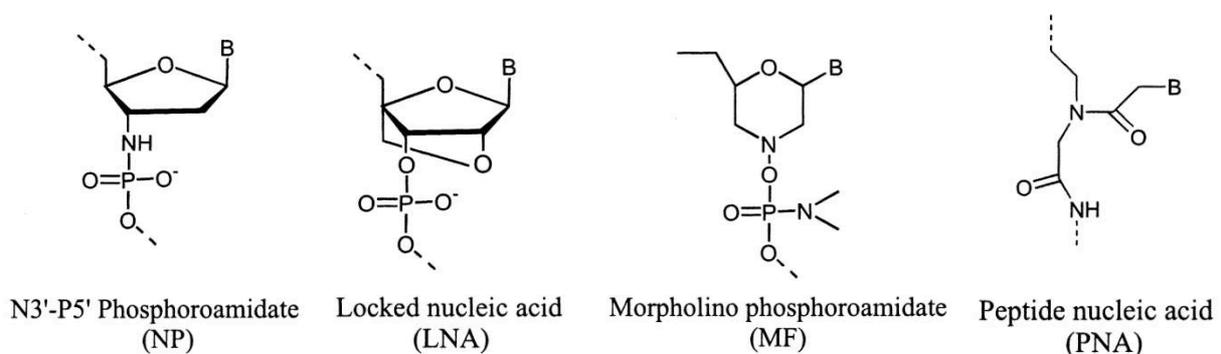


Figure 1.7 : Chimies des oligonucléotides antisens de troisième génération

Les N3'-P5' Phosphoroamidates (NP)

Les Phosphoroamidates (NP) sont des oligonucléotides où le groupement 3' hydroxyle du déoxyribose est remplacé par un groupement amine (Figure 1.7). Ces ON sont résistants aux nucléases, ont une forte affinité pour leur cible complémentaire et n'activent pas la RNase H.

Leur efficacité et spécificité en tant que bloqueur stérique de la traduction a été démontrée à plusieurs reprises en cellules et *in vivo* (par exemple, (Faria et al., 2001)).

Un autre type de blocage stérique, moins étudié mais qui s'est révélé prometteur, est l'inhibition de l'activité de rétro-transcription de la télomérase par un ON complémentaire de la composante ARN de cette enzyme. Il a en effet été démontré que GRN163L, un ON 13mer N3'-P5' thio-phosphoroamidate, inhibe l'activité de la télomérase à la fois en cellules et *in vivo*, dans un modèle de xenogreffe murin (Dikmen et al., 2005). A la vue de ces résultats encourageants, des essais cliniques ont débuté avec GRN163L pour le traitement de plusieurs cancers (Geron corporation). Il a toutefois été montré que l'effet anti-métastatique de cet ON passerait au moins en partie par son interaction non spécifique avec des composants cellulaires impliqués dans l'adhésion (Jackson et al., 2007).

A ce jour, GRN163L est le seul oligonucléotide de la classe des NP en essais cliniques.

Les Locked Nucleic Acids (LNA)

Les Locked Nucleic Acids (LNA) sont des ribonucléotides au sein desquels un pont méthylène relie l'Oxygène en 2' du ribose avec le Carbone en 4' (Figure 1.7), les fixant dans une conformation C 3' endo qui réduit la flexibilité du ribose. Ils ont été synthétisés pour la première fois en 1998 par les équipes de Wengel et Imanishi. L'introduction de LNA dans un ON ADN induit un changement de conformation du duplexe ON/ARN vers une hélice de type A (Kurreck, 2008). Les LNA sont résistants aux nucléases, spécifiques, de synthèse facile mais se distinguent surtout des autres ON par une affinité exceptionnelle et inégalée pour leur cible ARN ou ADN. L'introduction d'un seul LNA au sein d'un ON ADN provoque en effet une augmentation d'environ 10°C du T_m (température de demi-dissociation) du duplexe ON/ARN (Kurreck, 2003). Le changement conformationnel induit par un nucléotide LNA est si important qu'il se traduit par une modification de la conformation de nucléotides ADN voisins (Kurreck, 2008). Du fait de ces propriétés structurales, deux catégories d'ON composés à la fois de monomères LNA et ADN ont été conçus.

Le premier modèle d'ON de ce type, appelé "mixmer", correspond à un ON ADN au sein duquel sont dispersés des LNA, à raison d'un nucléotide sur deux ou trois le long de la séquence. L'introduction de deux LNA consécutifs à l'extrémité 3' de ces ON a été montrée

comme suffisante pour conférer une forte résistance aux exonucléases (Kurreck, 2008). Du fait du changement conformationnel induit par les LNA et de leur rigidité, ces ON n'activent pas la RNase H et agissent comme bloqueur stérique de la traduction ou comme modulateur de l'épissage (Braasch et al., 2002) (Guterstam et al., 2008). Les mixmer LNA-ADN ont également démontré un potentiel pour le ciblage de miARN (Lanford et al., 2010) (Obad et al., 2011).

Un second type d'ON chimérique, baptisé "gapmer" et initialement développé pour la seconde génération d'ON antisens, est composé de deux segments LNA continus aux extrémités de l'ON, séparés par un segment central de nucléotides ADN. L'intérêt de ces ON réside dans la possibilité d'activer la RNase H lorsque que le segment central d'ADN dépasse une longueur de 7 à 8 nucléotides (Kurreck et al., 2002), tout en bénéficiant des propriétés d'affinité uniques des LNA. Les gapmers sont plus sensibles aux endonucléases que les mixmers mais démontrent une forte efficacité d'inhibition de la traduction (Braasch et al., 2002).

La première utilisation de ces ON chimériques LNA-ADN en cellules et *in vivo* a démontré non seulement l'efficacité et la stabilité de ces molécules, mais également leur absence de toxicité (Wahlestedt et al., 2000), même si une étude ultérieure évoque une certaine hépatotoxicité (Swayze et al., 2007). A l'issue des différents travaux effectués sur les LNA, les gapmers s'imposent comme les ON LNA les plus prometteurs pour des applications thérapeutiques antisens.

Trois essais cliniques seraient d'ailleurs actuellement en cours avec des ON LNA gapmers, dirigés tous trois contre une cible impliquée dans le cancer (Bennett and Swayze, 2010). Il est cependant important de noter que c'est un LNA mixmer qui a été le premier ON ciblant un micro ARN à entrer en phase d'essais cliniques en 2008, pour le traitement de l'infection par le virus de l'Hépatite C. Cet ON cible en effet miR-122, un miARN exprimé dans le foie et impliqué dans la réplication du virus de l'Hépatite C et dans le métabolisme du cholestérol (santaris.com).

Les morpholinos

Les ON Morpholinos sont des analogues d'ADN au sein desquels le ribose est remplacé par un cycle morpholine et les liaisons phosphodiester sont substituées par des liaisons phosphoroamidate (Figure 1.7). Ce type d'ON a été décrit pour la première fois en 1997 (Summerton and Weller, 1997), il n'active pas la RNase H, est résistant aux nucléases et possède une affinité pour sa cible ARN similaire à celle d'un ON ADN. En outre, c'est une molécule neutre qui n'interagit pas ou peu avec les protéines du sérum.

Les morpholinos sont largement utilisés comme outils pour des études fonctionnelles en biologie du développement. Ils sont facilement micro-injectables et bien tolérés par les oocytes

et les embryons d'organismes modèles (xénope, poisson zèbre, oursin...) où ils inhibent la traduction d'un ARNm pendant une fenêtre temporelle. L'étude du phénotype de l'animal permet ensuite d'identifier le rôle de la protéine pendant le développement, même si quelques problèmes de manque de spécificité sont fréquemment soulevés (Eisen and Smith, 2008).

Les morpholinos sont également utilisés comme bloqueurs stériques de la traduction et pour la modulation de l'épissage. Dans une des études les plus convaincantes concernant cette seconde application, le traitement *ex vivo* de cellules précurseurs érythroïdes de patients atteints de β -thalassémie a permis de restaurer un épissage correct de l'ARNm de la β -globine et la production d'Hémoglobine A (Lacerra et al., 2000).

Moins de dix ON morpholinos seraient actuellement en essais cliniques, dont un ayant pour application le saut d'exon dans le cadre de la DMD.

Les Peptide Nucleic Acids (PNA)

Les Peptide Nucleic Acids ou PNA sont des analogues d'ADN dont le squelette sucre Phosphate est substitué par un squelette pseudo-peptidique, composé d'unités 2-aminoéthylglycine, sur lesquelles sont greffées des bases azotées (Figure 1.7). En raison de leur squelette pseudo-protéique, leurs extrémités sont désignées par "Nter" et "Cter" à la place de 5' et 3', respectivement. La première description de ces ON dans la littérature a été faite par Nielsen en 1991 (Nielsen et al., 1991).

Les PNA furent initialement conçus en tant que ligands du grand sillon de l'ADN où ils étaient supposés former une triple hélice. En effet, un oligonucléotide oligopyrimidique peut se fixer selon certaines règles sur une cible oligopurique *via* des liaisons Hoogsteen ou reverse Hoogsteen, formant ainsi un triplex composé de la double hélice d'ADN et de l'oligonucléotide (Figure 1.8). De manière inattendue, le complexe préférentiellement formé par un PNA oligopyrimidique sur une séquence d'ADN oligopurique correspond à un triplex par invasion de brin (Nielsen et al., 1991). Dans ce cas de figure, un premier PNA ouvre la double hélice d'ADN et s'hybride avec le brin qui lui est complémentaire par des liaisons Watson-Crick. Le second PNA vient ensuite former un triplex en se fixant sur le duplexe PNA/ADN par des liaisons Hoogsteen, ou reverse Hoogsteen avec le brin ADN oligopurique. Un complexe PNA_2/ADN est ainsi formé, déplaçant le brin d'ADN oligopyrimidique (Figure 1.8).

Bien que souvent moins favorables et nécessitant parfois l'ajout de modifications chimiques sur le PNA, d'autres complexes peuvent être formés tels qu'un triplex sans invasion de brin ou encore un duplexe ou double-duplexe (avec des PNA pseudo-complémentaires) par invasion de brin. Dans le cas des duplexes, il n'existe pas de contrainte de séquence oligopurique pour la cible. La fixation de PNA sur l'ADN peut avoir diverses applications que sont

l'inhibition ou l'activation de la transcription, ainsi que l'induction de modifications génomiques ciblées (Nielsen, 2010).

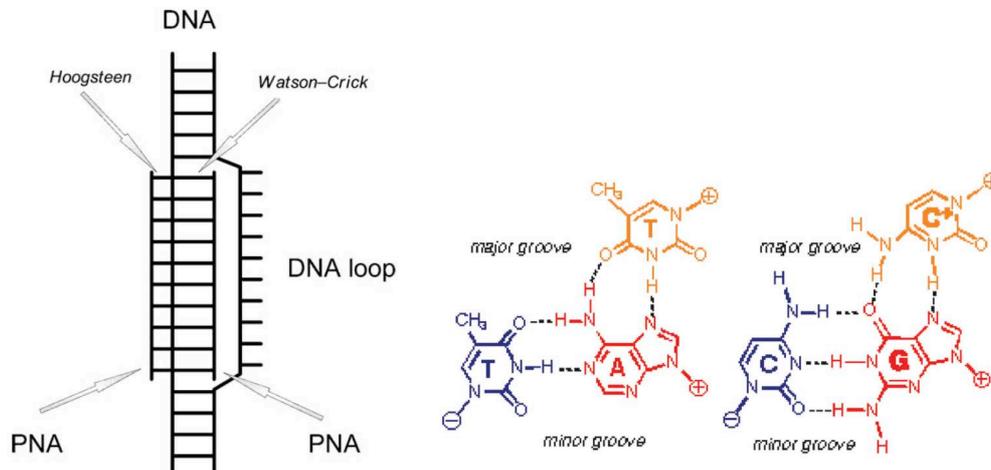


Figure 1.8 : Fixation d'un PNA en triplex par invasion de brin (Nielsen, 2010) et motifs d'un triplex pyrimidique T·A /T et C·G/C+ (Duca et al., 2008)

En rouge : brin purique ADN, en bleu : brin pyrimidique PNA fixé en duplexe par liaisons Watson-Crick, en orange : brin pyrimidique PNA formant une triple hélice par liaisons reverse Hoogsteen

Les PNA ont également la capacité de se fixer sur l'ARN en formant un duplexe PNA/ARN ou dans le cas d'une séquence ARN oligopurique, un triplex PNA₂/ARN très stable. Les propriétés de fixation des PNA sur l'ARN et leurs caractéristiques intrinsèques sont particulièrement attractives pour les approches antisens avec notamment une forte résistance aux nucléases et aux protéases et de fortes affinité et spécificité pour leur cible. Par ailleurs, les PNA sont des molécules neutres qui n'interagissent pas ou peu avec les protéines du sérum et qui n'activent pas la RNase H (Braasch and Corey, 2002).

Les PNA ont été testés pour la première fois en cellules en 1992, où la microinjection de PNA ciblant l'ARN de l'antigène T de SV40 s'est traduite par une réduction de la quantité de protéine produite dans les cellules (Hanvey et al., 1992). Toutefois, le PNA utilisé pouvant s'hybrider à la fois sur l'ADN et sur l'ARN, les auteurs ne purent conclure sur une inhibition de la transcription ou de la traduction. Les PNA ont depuis été intensivement étudiés en tant que bloqueurs stériques de la traduction ainsi que pour la modulation de l'épissage.

Malgré certains résultats encourageants *in vivo*, aucun PNA n'a fait l'objet d'essais cliniques à ce jour, ceci s'expliquant surtout par leur mauvaise capacité d'internalisation cellulaire et leur faible solubilité (Kurreck, 2008).

1.2 Les ribozymes et DNAzymes

C'est au début des années 80 que l'activité d'auto-épissage de l'intron du groupe I de *Tetrahymena thermophila* fut découverte par Cech (Kruger et al., 1982) qui nomma cet ARN, doué d'une activité catalytique sans intervention d'une composante protéique, ribozyme. Quelques mois plus tard, Altman mit à jour le rôle actif de la composante ARN de la Ribonucléase P dans le processus de maturation des ARN de transfert (Guerrier-Takada et al., 1983). Ce travail montrait pour la première fois qu'un ARN pouvait cliver un substrat *en trans* et donc exercer une activité semblable à celle d'une enzyme protéique. Un nombre restreint de ribozymes "naturels" ont été identifiés depuis, principalement chez des virus et bactéries mais également chez certains métazoaires tels que la salamandre ou le cricket.

Ces ribozymes naturels peuvent être répartis en deux catégories selon leur activité catalytique. Le premier groupe comprend les ribozymes à activité d'auto-épissage, tels que les introns du groupe I et II dont la taille varie de quelques centaines à plusieurs milliers de nucléotides. La seconde catégorie correspond aux ribozymes à activité de clivage, tels que la RNase P et les ribozymes de petite taille (tête de marteau, épingle à cheveux, ribozyme du virus de l'hépatite Delta et ribozyme du virus satellite Varkud de *Neurospora*) dont la longueur oscille entre 30 à 150nt et qui catalysent un clivage intramoléculaire (Serganov and Patel, 2007).

Les ribozymes à têtes de marteau, composés de trois hélices, furent initialement isolés de viroïdes de plantes chez lesquels ils prennent en charge les concatémères générés lors de la réplication en cercle roulant, et ils sont à ce jour les ribozymes les mieux caractérisés. Une sélection *in vitro* à partir des séquences naturelles de ces ribozymes a permis d'isoler avec succès des variants capables de dégrader un ARN cible *en trans* (Haseloff and Gerlach, 1988), ouvrant ainsi la voie à l'utilisation des ribozymes pour des applications de régulation génique à visée thérapeutique. Cette sélection a mis à jour des variants raccourcis de 40nt composés d'un domaine catalytique entouré de deux bras de fixation de séquence variable, lui donnant sa spécificité de reconnaissance (Figure 1.9 A). Ces ribozymes artificiels se fixent sur leur cible ARN par complémentarité de séquence *via* des liaisons Watson-Crick, puis dégradent celle-ci par une réaction de trans-estérification au niveau d'un motif de type NUH (avec H correspondant à A, U ou C), générant des extrémités 2'3' Phosphate cyclique et 5' hydroxyle (Wu et al., 2009). Les ARN étant extrêmement sensibles à la dégradation par les ribonucléases, diverses modifications chimiques protectrices ont été ajoutées (Figure 1.9 A) pour augmenter la résistance aux nucléases de ces ribozymes tout en conservant leur efficacité catalytique (Usman and Blatt, 2000).

De nombreuses études en cellules et en modèles animaux sont actuellement en cours (Bhindi et al., 2007) mais aucun DNAzyme n'a atteint le stade des essais cliniques jusqu'à présent.

Il semble toutefois que l'avantage à utiliser des acides nucléiques catalytiques dans les systèmes biologiques, par rapport aux ON antisens ou aux ARN interférents, n'ait jusqu'alors pas été démontré. Même si des études sont en cours pour sélectionner des acides nucléiques catalytiques indépendants du Mg^{2+} (Hollenstein et al., 2009), leur besoin élevé en cations divalents comme cofacteurs est probablement l'une des raisons de la perte de vitesse de ce domaine, les concentrations des tests d'activité *in vitro* étant très éloignées des conditions physiologiques (10mM en Mg^{2+} *in vitro* contre moins d'1mM en cellules) (Kurreck, 2008). On peut en outre avancer que des contraintes de conformation active se sont vraisemblablement ajoutées aux difficultés rencontrées par les acides nucléiques enzymatiques.

1.3 L'ARN interférence

L'ARN interférence est un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle conservé au cours de l'évolution. Découvert en 1998 chez le nématode *C. elegans* (Fire et al., 1998), il est initié par de longs ARN double-brin qui sont raccourcis par la ribonucléase Dicer en duplexes de 21 à 23nt, avec des extrémités 3' sortantes de 2nt. Ces petits ARN double-brin, nommés siARN (short interfering ARN), sont ensuite pris en charge par le complexe multi-protéique RISC. La protéine multi-fonctionnelle Argonaute 2 présente au sein du RISC sépare alors les deux brins d'ARN et dégrade le brin sens pour ne conserver que le brin antisens, complémentaire de l'ARNm cible. Le complexe RISC est ensuite guidé par ce brin jusqu'à sa cible et l'hybridation des deux séquences d'ARN complémentaires provoque le clivage de l'ARNm par la nucléase Argonaute 2. Le complexe RISC, toujours chargé du brin antisens, peut ensuite se diriger vers un autre ARNm pour le cliver à son tour, ce mécanisme peut donc être qualifié de catalytique (Rana, 2007).

Jusqu'en 2001, les études sur l'ARN interférence furent uniquement conduites sur des cellules d'organismes modèles non mammaliens du fait du déclenchement d'une réponse Interféron (IFN) de type I par les ARN double-brin de plus de 30nt dans les cellules de mammifères. La voie IFN provoque en effet une inhibition générale de la synthèse protéique

par dégradation des ARNm et il est alors impossible de distinguer les effets spécifiques et aspécifiques de longs ARN interférents dans ces cellules.

En 2001, Tuschl publia la preuve de concept établissant qu'un duplexe ARN synthétique de 21nt pouvait inhiber spécifiquement la synthèse de protéines par ARN interférence dans des cellules de mammifères, notamment humaines, sans déclencher de réponse IFN (Elbashir et al., 2001). Dès lors, un très grand nombre de travaux furent consacrés à l'exploitation de ce mécanisme naturel en stratégie antisens à part entière, dans le but d'inhiber l'expression de gènes d'intérêt.

Outre les siARN synthétiques qui contournent l'étape de clivage par Dicer, les shARN (short-hairpin ARN) sont également communément utilisés en tant qu'ARN interférents. Un shARN correspond à un court duplexe intramoléculaire d'ARN qui sera converti en siARN par Dicer, et dont l'intérêt réside dans la possibilité de le faire produire de manière stable dans la cellule, par un vecteur ADN ou viral. Le mécanisme d'ARN interférence ainsi que ses principales molécules effectrices sont représentés sur la Figure 1.10.

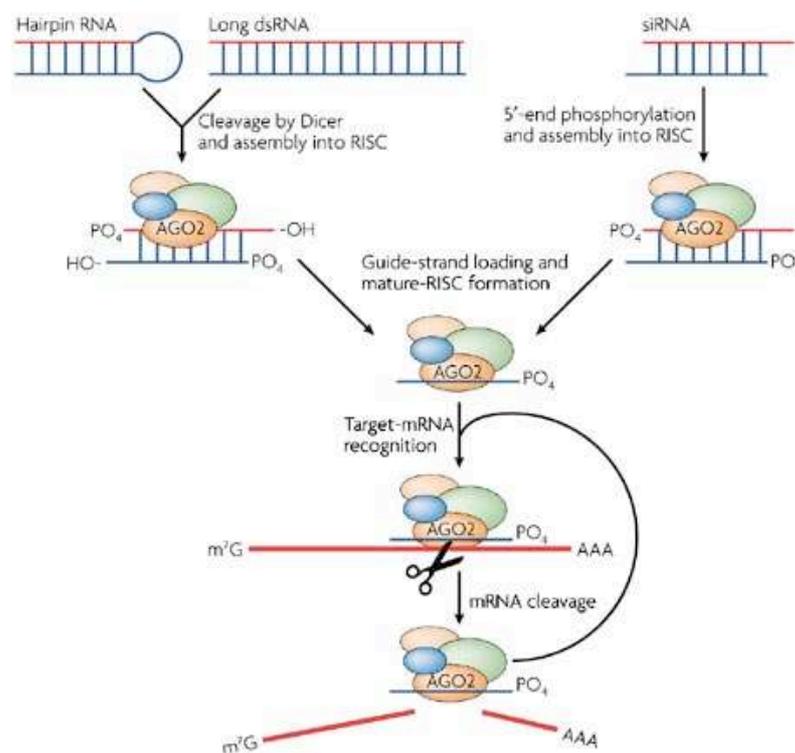


Figure 1.10 : Mécanisme d'ARN interférence initié par un long ARN double-brin, un siARN ou un shARN (Rana, 2007)

Les siARN sont, comme toute molécule d'ARN, sensibles aux ribonucléases. D'autre part, leur spécificité est perfectible puisque certains siARN peuvent s'hybrider partiellement sur des cibles secondaires et induire ainsi une inhibition non spécifique de la traduction de ces ARNm "off-target" (Jackson et al., 2003). Enfin, un paramètre important à prendre en considération pour les applications *in vivo* est le caractère potentiellement immunogène des siARN. Il a en effet été observé en cellules humaines et *in vivo* chez la souris que certains motifs de séquence de siARN peuvent déclencher la production d'IFN- α et de cytokines pro-inflammatoires médiée par des récepteurs Toll-like intracellulaires tel que TLR 7 (Hornung et al., 2005). Chez la souris, cette production de cytokines provoque une réponse immune systémique et une toxicité non souhaitable pour l'utilisation des siARN en clinique (Judge et al., 2005).

Diverses études ont contribué à améliorer ces limitations en combinant différentes modifications chimiques sur les siARN, cette stratégie n'étant pas applicable aux shARN qui sont directement produits dans la cellule. Parmi les modifications les plus pertinentes, on peut citer l'incorporation dans les siARN de 2'-O-méthyl, qui permettent d'augmenter la résistance aux nucléases, la spécificité et de garantir une non-immunogénicité. L'ajout de liaisons Phosphorothioates et de 2' fluoro contribue également à augmenter la stabilité des siARN. L'incorporation de ces modifications doit bien entendu suivre certaines règles, comme le ciblage des modifications sur le brin sens et aux extrémités du brin antisens, pour ne pas affecter l'efficacité des ARN interférents synthétiques (Kurreck, 2008).

L'engouement qu'a suscité l'ARN interférence s'est traduit dans les faits par un nombre important de publications relatant de l'utilisation de siARN pour cibler de nombreux gènes, sur divers systèmes cellulaires et animaux. Le succès de certains travaux a abouti au lancement des premiers essais cliniques moins de quatre ans après la découverte d'Elbashir. En novembre 2010, une quinzaine de siARN étaient en essais cliniques principalement pour le traitement de cancers, d'infections virales, de maladies inflammatoires et de pathologies ophtalmologiques (Lares et al., 2011). Cependant, aucun d'entre eux n'a à ce jour été autorisé sur le marché et le Bevasiranib (Opko Health), ciblant le VEGF pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et premier siARN à avoir atteint la phase III, a été abandonné en 2009 pour des raisons d'inefficacité.

Même si l'ARN interférence offre des perspectives prometteuses, le chemin à parcourir avant de voir le premier siARN mis sur le marché risque d'être encore long. En effet, la plupart des essais cliniques ont débuté avant la découverte que des modifications chimiques pouvaient réduire l'immunogénicité des siARN. En dépit de l'efficacité des siARN à inhiber la traduction en cellules, le caractère non-immunogène semble crucial pour l'utilisation des ARN interférents en

thérapeutique, de même que la question de la vectorisation qui reste le principal problème de tous les ON pour des applications thérapeutiques.

2. La vectorisation des oligonucléotides

Pour démontrer une activité *in vivo*, un ON doit atteindre le compartiment cellulaire où se trouve sa cible. Il doit se trouver en quantité suffisante dans le noyau ou le cytoplasme s'il cible un ARNm, ou dans le noyau s'il cible un pré-ARNm. L'administration d'un ON par voie systémique est nécessaire si l'on souhaite que tout tissu puisse être potentiellement ciblé ainsi que pour le développement de thérapies pertinentes, notamment dans le contexte de maladies génétiques telle que la DMD, où chaque muscle doit être traité. Entre l'injection systémique d'un ON et son hybridation sur sa cible, celui-ci doit cependant franchir de nombreuses barrières biologiques, chacune déterminante pour les paramètres pharmacocinétiques de l'ON. La problématique de l'adressage des ON antisens et siARN dans le bon compartiment des cellules du tissu ciblé est un réel défi pour la réussite et la généralisation de leur utilisation en clinique.

Ce chapitre vise à présenter les différentes barrières biologiques auxquelles sont confrontés les ON *in vivo* ainsi que les principales stratégies développées à ce jour pour la vectorisation des ON.

2.1 Barrières biologiques et nécessité de la vectorisation

2.1.1 Les barrières biologiques à franchir pour atteindre une cellule cible

Le premier écueil auquel est confronté un ON lorsqu'il est injecté dans la circulation sanguine est son élimination rapide par le système de filtration rénale. Les molécules de poids moléculaire inférieur à 5000 Da sont en effet rapidement ultrafiltrées par le glomérule rénal et excrétées dans les urines (Brenner et al., 1976). Même si une fraction des ON ultrafiltrés peut être réabsorbée par les cellules tubulaires rénales, cette clairance se traduit par une élimination massive des ON circulant en quelques minutes seulement. Les ON PS peuvent retarder ce phénomène en interagissant avec des protéines du sérum, ce qui permet d'augmenter leur temps de circulation et donc leur infiltration dans les tissus. Les autres catégories d'ON, et notamment les ON neutres tels que les PNA et les morpholinos, interagissent peu avec les protéines sériques et sont donc généralement rapidement excrétés dans les urines (Nielsen, 2010).

D'autre part, les ON peuvent être rapidement dégradés par des nucléases sériques ou tissulaires. L'intégration de diverses modifications chimiques, décrites dans le chapitre I, permettent aux siARN et aux ON antisens des deuxième et troisième générations d'atteindre une résistance aux nucléases suffisamment élevée pour prétendre avoir une action physiologique.

Le système réticuloendothélial regroupe des cellules phagocytaires telles que les monocytes circulant, les macrophages tissulaires et notamment spléniques ou encore les cellules hépatiques de Kupffer qui peuvent constituer jusqu'à 30% des cellules du foie. Ces cellules peuvent phagocyter les ON opsonisés par diverses molécules et provoquer d'une part leur séquestration principalement dans le foie et la rate et d'autre part, le déclenchement d'effets secondaires toxiques (Juliano et al., 2009).

Pour pénétrer dans les tissus depuis la circulation générale, les ON doivent franchir les cellules endothéliales qui recouvrent le lumen des vaisseaux sanguins et qui forment des jonctions serrées entre elles *via* diverses molécules d'adhésion. Les macromolécules peuvent franchir cet endothélium vasculaire en empruntant deux voies : de petits pores abondants, résultant de l'imperfection des jonctions entre les cellules et laissant passer des molécules de taille inférieure à 45 Å, et des pores de grande taille plus rares, dont l'origine est discutée et qui laissent passer des molécules d'un diamètre allant jusqu'à 250 Å (Juliano et al., 2009). Les ON peuvent passer par les pores de petite taille, avec une cinétique de franchissement toutefois ralentie lorsqu'ils sont chargés.

Il est à noter que l'endothélium vasculaire du foie et de la rate possède de larges fenestrations de 100 à 200 nm de diamètre entre les cellules endothéliales, ceci contribuant encore une fois à l'accumulation des ON principalement dans ces organes après leur injection. Le passage des ON du sang vers les tissus peut également être facilité dans les zones d'inflammation où la perméabilité vasculaire est augmentée pour permettre aux cellules de la réponse immunitaire de s'y infiltrer. Enfin, la vascularisation souvent altérée des tumeurs peut également être favorable à l'infiltration des ON lorsque qu'elle se traduit par une augmentation de la taille des pores de l'endothélium, avec une taille maximale rapportée de 700nm de diamètre (Juliano et al., 2009). La perméabilité de la vascularisation tumorale aux ON est toutefois limitée par une pression interstitielle élevée dans la plupart des tumeurs.

Lorsqu'un ON parvient à franchir l'endothélium vasculaire, il doit alors diffuser dans la matrice extracellulaire pour atteindre les cellules du tissu à cibler. La matrice extracellulaire est

composée d'un réseau dense de protéines fibreuses et de protéoglycanes qui peut ralentir la diffusion des macromolécules et parfois même les séquestrer (Juliano et al., 2008).

2.1.2 Internalisation dans la cellule et sortie des endosomes

Lorsque l'ON atteint enfin les cellules du tissu, il doit traverser la membrane plasmique de celles-ci pour pénétrer dans la cellule et y rencontrer sa cible. Comme la plupart des macromolécules, les ON sont principalement internalisés par endocytose et plus particulièrement par pinocytose, dont on distingue quatre voies majeures classées selon les protéines qui interviennent pendant la phase d'internalisation (Figure 2.1) :

- la macropinocytose
- l'endocytose médiée par la clathrine
- la voie *caveolae*
- diverses voies indépendantes de la cavéoline et de la clathrine

La macropinocytose consiste schématiquement en l'endocytose de molécules par simple internalisation d'un échantillon du milieu ambiant, initiée par l'activation transitoire de récepteurs à tyrosine kinase suite à une concentration élevée en facteurs de croissance (Sahay et al., 2010) ou activée constitutivement dans certaines lignées cellulaires (Jones, 2007).

Les trois autres voies d'endocytose conduisent à l'internalisation de macromolécules suite à leur fixation sur un récepteur membranaire protéique ou sur un composant membranaire non protéique (sphingomyéline, cholestérol, phospholipides...) (Bareford and Swaan, 2007).

Le mécanisme d'entrée nommé "endocytose médiée par un récepteur" se déroule en plusieurs étapes avec tout d'abord la fixation du ligand sur son récepteur membranaire. Le complexe ligand-récepteur est ensuite internalisé par bourgeonnement et détachement d'une vésicule de membrane plasmique sur la face cytosolique avec l'intervention, le plus souvent, de la GTPase dynamine.

Une fois la vésicule d'endocytose formée, et quelque soit la voie de pinocytose empruntée, celle-ci est acheminée séquentiellement vers divers compartiments endomembranaires de pH faible, à commencer par un endosome précoce ou endosome de tri. Les évènements de fusion de ces compartiments sont contrôlés notamment par les protéines SNARE tandis que le routage des vésicules vers un type ou l'autre d'endosome est principalement médié par les GTPases Rab, localisées dans les membranes des vésicules (Juliano et al., 2008). Plusieurs scénarios sont alors envisageables : la vésicule nouvellement formée est conduite vers un endosome précoce puis un endosome recyclant, qui provoque le

retour du récepteur et éventuellement de son ligand à la surface de la cellule. Dans un second scénario, l'endosome précoce est acheminé vers un endosome tardif puis vers un lysosome, où le récepteur et/ou son ligand sont dégradés enzymatiquement. Le contenu des endosomes précoces et tardifs peut également aboutir dans le Golgi (Figure 2.1) (Ming, 2011).

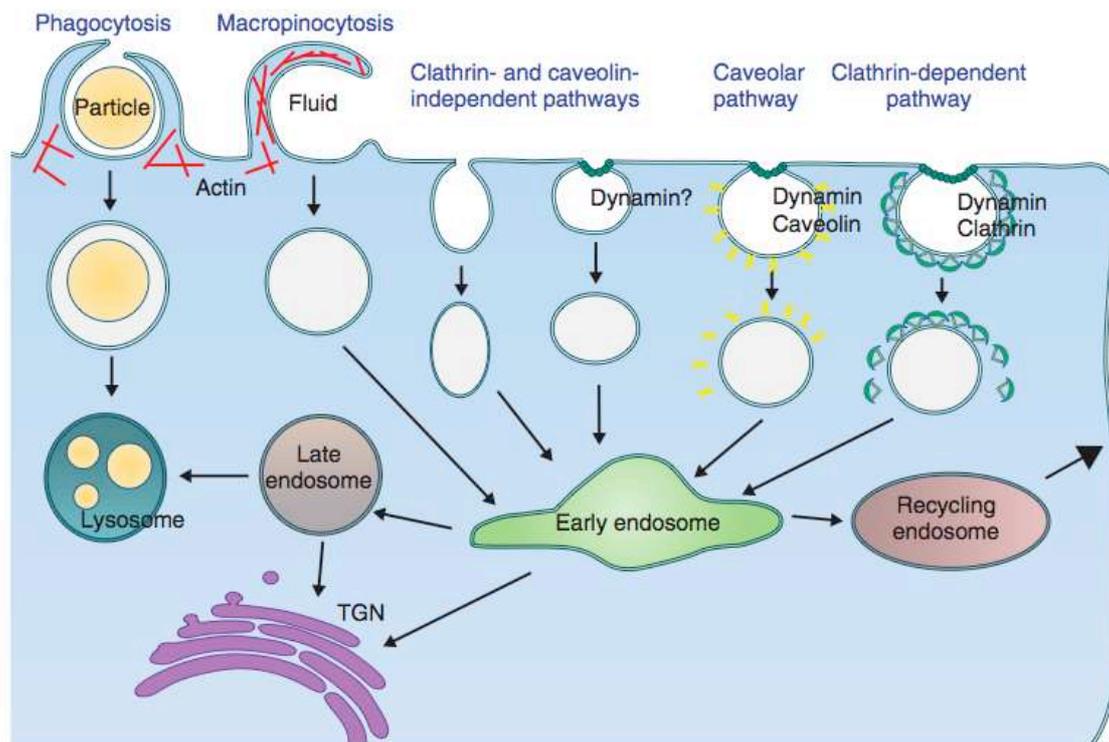


Figure 2.1 : Les principales voies d'endocytose et le devenir des vésicules (Ming, 2011)

La phagocytose est la seule voie d'endocytose non pinocytaire. TGN : *Trans-Golgi Network*

La voie d'endocytose empruntée par un même récepteur peut varier selon divers paramètres tels que l'état physiologique de la cellule, le type cellulaire ou encore la concentration du ligand (Juliano et al., 2008). De même, le devenir des vésicules internalisées par une même voie d'endocytose peut différer selon les interactions à la membrane de la molécule internalisée ainsi que les molécules impliquées dans la formation des vésicules (Bareford and Swaan, 2007).

L'étape d'internalisation dans la cellule n'est pas l'étape finale pour un ON puisque celui-ci doit encore sortir des endosomes pour atteindre sa cible. Ce phénomène peut se produire à diverses étapes du cheminement des vésicules le long de la voie endolysosomale, mais en cas d'échec, le ligand est le plus souvent rejeté par exocytose hors de la cellule lors du recyclage du

récepteur, ou dégradé dans les lysosomes. L'absence de sortie des endosomes est un obstacle majeur de l'adressage cellulaire, mais si l'ON parvient toutefois à en sortir, sa taille lui permet alors de diffuser librement entre le cytoplasme et le noyau pour atteindre sa cible (Leonetti et al., 1991).

De manière générale et d'après de nombreuses études en cellules, il semble que les ON antisens et siARN soient faiblement internalisés, ou dans le cas contraire, restent prisonniers des endosomes (Kurreck, 2008). Les PNA et siARN sont probablement les catégories d'ON qui montrent les plus mauvaises capacités d'internalisation et aucune activité de ces molécules non vectorisées n'a pu être démontrée en culture (Ming, 2011), si ce n'est à une concentration très élevée comme 30 μ M en PNA (Sei et al., 2000).

De nombreux travaux ont néanmoins montré une activité antisens *in vivo* avec certains ON nus, et on peut notamment relever le succès de certains travaux et/ou études cliniques menées sur des ON PS, 2' O-methoxyethyl ou LNA (Kurreck, 2008). Ces résultats positifs sont toutefois à relativiser puisque l'injection de ces ON est souvent locale ou, dans le cas d'une injection systémique, leur activité est principalement détectée dans le foie et les reins où les ON s'accumulent préférentiellement. Dans ces conditions, les cellules ciblées sont exposées à de fortes concentrations locales d'ON qui ne seraient pas compatibles avec le ciblage de tout autre organe en injection systémique sans générer de toxicité. On peut relever en outre l'efficacité *in vivo* d'ON morpholinos moduleurs d'épissage dans le contexte de la DMD, dont l'injection systémique conduit à un saut d'exon détecté dans la quasi-totalité des muscles des souris traitées. L'internalisation de ces ON serait toutefois largement facilitée par la fragilisation des membranes des cellules musculaires dystrophiques (Aartsma-Rus and van Ommen, 2009).

Malgré ces exemples d'utilisation d'ON nus notamment *in vivo*, la nécessité de développer des stratégies de vectorisation pour donner tout leur potentiel thérapeutique à ces stratégies antisens est devenue évidente au cours des dernières années. Un vecteur idéal se devra tout d'abord d'augmenter l'internalisation dans les cellules d'intérêt et la sortie des endosomes de l'ON sans en altérer la diffusion dans le noyau, ni interférer avec la fixation de l'ON sur sa cible. Si ces conditions sont remplies, le traitement de cellules en culture par un ON vectorisé doit conduire à une activité améliorée par rapport à celle d'un ON seul. En outre, l'agent de vectorisation devra dans l'idéal démontrer une amélioration des paramètres pharmacocinétiques de l'ON *in vivo* (diminution de la clairance rénale et de la séquestration phagocytaire, augmentation de l'infiltration dans les tissus) sans générer toutefois de toxicité.

2.2 Stratégies de vectorisation des oligonucléotides

Différentes approches ont été développées ces dernières années pour vectoriser les ON antisens et siARN, et augmenter ainsi leur efficacité. En cellules, plusieurs méthodes de vectorisation sont aujourd'hui disponibles, en particulier pour les ON chargés, avec des efficacités toutefois variables. *In vivo*, beaucoup de progrès restent à faire et dans de nombreux essais cliniques, les ON sont encore utilisés nus. Les principales stratégies de vectorisation des ON développées à ce jour sont présentées dans le paragraphe suivant.

2.2.1 Les méthodes physiques

La première stratégie développée pour provoquer l'entrée des ON dans les cellules consiste à altérer la membrane plasmique cellulaire par des méthodes physiques telles que l'électroporation, la microinjection ou encore la perméabilisation. L'intérêt majeur de ces méthodes réside dans le contournement de l'étape de sortie des endosomes, puisque les ON ne pénètrent pas dans les cellules par endocytose.

L'électroporation permet la transfection de cellules par application d'impulsions électriques courtes et intenses générant une perméabilisation membranaire transitoire. Cette technique a été utilisée pour internaliser divers ON en cellules dont des PNA, siARN, NP et morpholinos (Koppelhus and Nielsen, 2003) (Hornung et al., 2005) (Gryaznov, 1999) (Kurreck, 2008). L'électroporation d'ON *in vivo* est potentiellement applicable pour une administration locale mais nécessite de plus amples développements.

La microinjection consiste, comme son nom l'indique, en l'injection d'une solution d'ON directement dans le cytoplasme ou le noyau de cellules. Cette technique a été utilisée pour les premières études d'activité cellulaire de PNA (Hanvey et al., 1992) et est actuellement employée pour les études de biologie du développement par microinjection de morpholinos dans des oocytes ou embryons d'organismes modèles (Eisen and Smith, 2008). Les limites de cette stratégie sont la difficulté à reproduire les volumes injectés, le caractère laborieux que représente l'injection de chaque cellule et l'impossibilité de transposer cette technique *in vivo*.

Enfin, la perméabilisation des cellules peut être réalisée par l'intermédiaire de toxines bactériennes telle que la Streptolysine O (SLO). La SLO est une exotoxine qui, suite à sa fixation sur la membrane plasmique de cellules de mammifères, forme des pores transmembranaires de

grande taille (jusqu'à 35nm de diamètre) par oligomérisation (Walev et al., 2001). L'ajout de cations divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) permet ensuite de refermer ces pores en seulement 10 à 30 secondes (Idone et al., 2008). La SLO permet donc une perméabilisation transitoire des cellules, et a été utilisée notamment pour transférer des PNA et des NP en cellules (Boutimah-Hamoudi et al., 2007) (Faria et al., 2001). Même si le traitement *ex vivo* de cellules de patients est possible, la perméabilisation par la SLO demeure toutefois inapplicable *in vivo*.

2.2.2 La vectorisation par des nanotransporteurs

La vectorisation des ON par des nanotransporteurs consiste schématiquement en la formation de complexes non covalents entre des molécules polycationiques et des ON chargés négativement. Cette stratégie, faisant intervenir des interactions électrostatiques, n'est pas applicable en l'état aux ON neutres tels que les PNA et les morpholinos. Ces structures polycationiques complexées interagissent avec les membranes plasmiques des cellules et peuvent ainsi être internalisées par endocytose ou simple translocation. Les nanotransporteurs peuvent être de deux natures chimiques principales puisqu'on distingue les lipides cationiques et les polymères cationiques.

Les lipides cationiques sont utilisés depuis plus de vingt ans pour l'internalisation cellulaire d'acides nucléiques. Ils peuvent être structurés en liposomes en combinaison avec des lipides neutres, pour former des vésicules artificielles composées d'une ou plusieurs couches de lipides encapsulant un compartiment aqueux qui peut contenir des ON. Alternativement, les ON peuvent être complexés sur la face extérieure des liposomes. Les lipides cationiques peuvent également former des lipoplexes, dont la structure multilamellaire est composée de couches lipidiques entre lesquelles sont complexés les ON (Kurreck, 2009).

Les polymères cationiques utilisés pour la vectorisation des ON peuvent être de nature peptidique, synthétique ou naturelle, avec une structure branchée ou linéaire. De très nombreux exemples de polymères ont été décrits dans la littérature parmi lesquels : poly-L-lysine, chitosan, cyclodextrine, atelocollagène ou encore Polyéthylèneimine (PEI). Les complexes formés entre des polymères et des acides nucléiques sont nommés polyplexes. Un des polymères les plus étudiés est probablement le PEI, qui permet une internalisation efficace des ON ainsi que leur sortie des endosomes. Cette dernière caractéristique s'explique par l'effet "éponge à protons" commun au PEI et à plusieurs polymères. Ce phénomène consiste en

l'acceptation de protons par le polymère endocyté, conduisant à l'entrée d'ions Cl⁻ et d'eau dans les endosomes puis à la déstabilisation osmotique et l'éclatement de ceux-ci (Aigner, 2008).

Qu'ils soient de type lipidique ou polymérique, les nanotransporteurs sont globalement soumis aux mêmes problématiques pour la vectorisation des ON. Tout d'abord, la stabilité des complexes formés avec les ON est souvent mise à mal par les différentes barrières biologiques à franchir pour atteindre les cellules cibles, et plus particulièrement par l'interaction des complexes avec des protéines sériques chargées négativement. En outre, des phénomènes d'agrégation et d'adsorption massive sur les cellules endothéliales sont à l'origine d'effets toxiques de ces molécules par obstruction de micro-vaisseaux (Kurreck, 2008). Une amélioration majeure pour corriger ces paramètres correspond à l'ajout de Polyéthylène glycol (PEG) sur les nanotransporteurs. Le PEG permet de stabiliser les complexes en limitant leur interaction avec des protéines anioniques du sérum, et contribue en outre à diminuer la toxicité des complexes, en réduisant leur agrégation et adsorption sur les endothélium (Lares et al., 2010). L'ajout de PEG contribue également à augmenter la solubilité et le temps de circulation des complexes tout en les protégeant de la phagocytose (Whitehead et al., 2009). Le nombre d'unités de PEG greffées sur les nanotransporteurs doit cependant être limité car un excès de celles-ci conduit à une diminution de l'internalisation cellulaire des complexes ainsi qu'à une stabilité trop élevée ne permettant pas leur dissociation dans le cytoplasme. On parle ainsi de "dilemme du PEG" (Kurreck, 2008).

La taille élevée de la plupart des nanotransporteurs, de l'ordre de la centaine de nm (Aigner, 2008), permet de réduire la clairance rénale des ON mais reste néanmoins fortement restrictive pour le franchissement de l'endothélium vasculaire de certains tissus, même si ceux-ci peuvent franchir aisément les endothélium fenestrés du foie et de la rate. Cette taille élevée semble néanmoins être un avantage dans certains cas pour l'infiltration et l'accumulation dans les tumeurs du fait de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Ce phénomène d'EPR, qui n'est pas ou peu observé avec les ON non vectorisés, s'explique principalement par la perméabilité vasculaire exaltée ainsi qu'un faible drainage lymphatique de certaines tumeurs (Juliano et al., 2008).

Il est important de noter que la stratégie de vectorisation par les nanotransporteurs peut éventuellement être combinée avec un ligand spécifique de certaines cellules pour développer une stratégie ciblée (voir paragraphe 2.2.3).

Ce sont notamment les liposomes de type SNALP (Stable Nucleic Acid Lipid Particle) ainsi que les polymères de PEI, dont les structures sont représentées sur la Figure 2.2, qui ont démontré une bonne efficacité pour la vectorisation d'ON, même *in vivo*.

En 2006, l'injection systémique de SNALP encapsulant des siARN dirigés contre l'ARNm de la protéine APOB a permis de démontrer pour la première fois une activité d'ARN interférence exogène spécifique de séquence chez les primates. Une seule injection intraveineuse de SNALP-siARN chez le macaque conduit en effet à une inhibition dose-dépendante de la production de protéine APOB dans le foie, jusqu'à 48h post-administration (Zimmermann et al., 2006). On peut toutefois regretter l'absence, dans cette étude, du contrôle "siARN non vectorisé" qui permettrait de déterminer quelle part de l'activité du complexe est due à la vectorisation efficace par les SNALP, et quelle part est due à l'accumulation naturelle de ces complexes dans le foie.

Dans le même temps, des siARN ciblant l'ARNm d'HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) complexés au PEI et administrés par voie intrapéritonéale ont démontré une inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe chez la souris (Urban-Klein et al., 2005). Dans cette étude, l'inhibition de l'expression d'HER-2 n'est pas observée lors de l'injection de siARN nus.

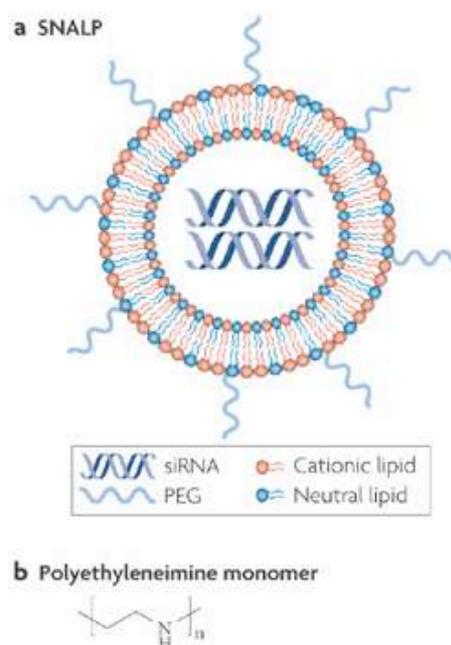


Figure 2.2 : Structures d'un SNALP (a) et du PEI (b) (Whitehead et al., 2009)

2.2.3 La vectorisation par conjugaison chimique à un transporteur : revue

Les ON peuvent également être vectorisés par conjugaison chimique directe avec un transporteur permettant l'internalisation éventuellement ciblée du conjugué. Les transporteurs développés dans le cadre de cette approche sont notamment les Cell Penetrating Peptides (CPP), de petites molécules chimiques telles que le cholestérol ou des vitamines, ou encore des acides nucléiques nommés aptamères.

La stratégie de vectorisation ciblée repose sur un ligand pouvant être internalisé par endocytose après fixation sur un récepteur exprimé à la surface des cellules de manière différentielle selon les tissus. Les intérêts principaux de ce type de vectorisation sont une concentration active d'ON plus faible et une réduction des effets non spécifiques. Une thérapie doublement spécifique qui affecterait une cible cellulaire précise uniquement dans le tissu à traiter est particulièrement attractive pour gagner en efficacité et réduire au minimum les effets secondaires potentiels.

La revue Marlin, et al. 2010 *ChemBioChem* fait état des caractéristiques et principaux résultats *in vivo* des différentes catégories de transporteurs qui ont été conjugués à un ON antisens ou siARN jusqu'à présent.

Delivery of Oligonucleotides and Analogues: The Oligonucleotide Conjugate-Based Approach

Fanny Marlin, Philippe Simon, Tula Saison-Behmoaras, and Carine Giovannangeli*^[a]

Delivery of Oligonucleotides and Analogues: The Oligonucleotide Conjugate-Based Approach

Fanny Marlin, Philippe Simon, Tula Saison-Behmoaras, and Carine Giovannangeli*^[a]

1. Introduction

Oligonucleotide-based drugs are currently being developed for many different applications, and in every case these drugs allow specific recognition of a cellular target that can be DNA, RNA, or a protein. Except when directed against extracellular proteins, oligonucleotides have to enter the cell to reach their targets and exhibit the expected activity. Naked, unmodified oligonucleotides do not efficiently enter intact cells by simple diffusion, because of the hydrophobic nature of the membrane lipid bilayer and the negative surface charge of cells. Although naked oligonucleotides have been used in many in vivo and clinical studies, it is now accepted that appropriate delivery systems are absolutely needed for the development of effective oligonucleotide therapeutics. Although efficient delivery approaches are available for cell culture experiments, delivery is obviously one of the most important limitations in oligonucleotide-based strategies on the road to the clinic. The most critical challenge is to achieve tissue distribution in vivo following systemic administration; then targeting the right tissue becomes crucial. Different approaches using viral and chemical delivery have emerged as promising (for recent reviews see refs. [1] and [2]).

In this paper, we will review chemical approaches for oligonucleotide delivery with particular focus on the ones that are based on molecular conjugates. Strategies of targeted delivery to particular cell types with conjugates will also be discussed. We will present and analyze some examples of recent advances in the field of conjugate-based delivery approaches, considering only antisense and small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides.

2. The Carrier–Cargo Conjugates: The Principles

In this section we will briefly describe typical examples of chemical moieties that have been chosen as carriers of oligonucleotides to allow cell-type-specific targeting or to enhance cellular uptake. These examples illustrate the general principles that govern the design of an appropriate delivery system. We will also describe some chemical and biological characteristics of the cargos, antisense and siRNA oligonucleotides. We will not present the chemical synthesis of the conjugates (for a recent review see ref. [3]).

2.1. Choice of the carrier

Different types of molecules have been attached to oligonucleotides to improve and sometimes target their intracellular de-

livery. Many are based on biomolecules that are naturally internalized to fulfill their cellular functions. Different classes of molecules and corresponding uptake mechanisms will be illustrated by describing the two major families, uptake enhancers and targeting carriers. We will briefly comment on the intrinsic uptake properties that are important for their application in oligonucleotide delivery.

2.1.1. Cell-penetrating peptides (CPPs) as uptake enhancers: The starting point of the development of peptide vectors was the discovery of intercellular transport of transcription factors, a quite unexpected mode of signal transduction.^[4] The concept of a “messenger protein” was proposed in the 1980s with the description of HIV-TAT transport to nucleus.^[5] These concepts were not exploited for the development of peptide vectors for a number of years, however.

The first transduction peptide, or cell-penetrating peptide, was derived from the homeodomain (DNA-binding domain) of antennapedia, a *Drosophila* homeoprotein. It is a 16-residue sequence that corresponds to the most conserved portion of the homeodomain, called penetratin, and is able to carry attached cargo into cells.^[6] Following this pioneer work a series of transduction peptides have been developed; the other prototypical CPPs are the TAT-derived peptides (Table 1).

Chemical variants have been synthesized to characterize the key residues and the role of physical conformations of these transduction peptides. Internalization mechanisms that differ depending on the peptides and are still unclear, although some general rules have emerged: most CPPs are basic peptides that are rich in arginine and lysine and interact with negative charges at the cell surface. The overall hydrophobicity also plays a key role in the uptake of short cationic peptides. However, it is not yet possible to claim that these gross peptide properties are the major factors because membrane composition and membrane potential have also been shown to be determinants of uptake efficiency.^[7]

2.1.2. Small organic molecules as targeting carriers: Focus on cholesterol and vitamins: Another way to deliver therapeutic nucleic acids is to conjugate them to molecules that are taken into specific cell types. Among these carriers, we will focus on small organic molecules, cholesterol, and vitamins that have

[a] F. Marlin, Dr. P. Simon, Prof. T. Saison-Behmoaras, Dr. C. Giovannangeli
Museum National d'Histoire Naturelle, CNRS, UMR7196, Inserm, U565
43 rue Cuvier, 75005 Paris (France)
Fax: (+33) 1-40793705
E-mail: giovanna@mnhn.fr

Table 1. Some of the most commonly used cell-penetrating peptides.

Peptide	Sequence	Origin
TRANSCRIPTION FACTOR-DERIVED PEPTIDES		
Tat	GRKKRRRQRRRPPQ	HIVTat
Peptide sequences corresponding to the third helix of homeodomains		
Anp	RQIKIWFQNRRMKWKK	<i>Drosophila</i> Antennapedia
Eng	SQIKIWFQNKRKIKK	human engrailed 2
Hox	RQVTIWFQNRRVKEKK	human HoxA13
Kno	KQINNWFINQRRKHWK	maize knotted I
AMPHIPATIC PEPTIDES		
transportan	GWTLNSSAGYLLKINLKALAALAKKIL	galanin and mastoparan
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	
RW9	RRWRRRWR	
Signal sequence-based peptides		
MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	gp41 fusion protein-NLS (SV40 T antigen)
POLYARGININE-BASED PEPTIDES		
Arg9	RRRRRRRRR	

been used to deliver siRNAs and antisense oligonucleotides into specific cells (see examples in Section 4). These molecules are naturally and preferentially absorbed into some tissues, and their transport pathways involve cell-surface receptors that efficiently internalize their ligand. These various receptors are expressed differentially on the membranes of certain cell types.

Circulating cholesterol is bound to lipoprotein particles such as low-density lipoprotein (LDL) or high-density lipoprotein (HDL). Cellular uptake is mediated mostly through the LDL receptor and the scavenger receptor class B type I (SR-BI, also known as Cla-I) for LDL and HDL, respectively. Vitamins are essential, but are not synthesized endogenously in humans. This latter property is interesting when vitamins are used as carriers because it avoids the induction of an immunostimulatory effect often observed with synthetic vectors (e.g., see ref. [8]). Moreover, vitamins are described to be internalized through cell-surface receptors, many of which are not yet well characterized. The recognition of a vitamin by its receptor often requires an interaction with binding proteins. For example, vitamin E (α -tocopherol) is internalized into cells after binding to lipoproteins (HDL or LDL) or other proteins found in the serum such as SEC14L_n (in which *n* is 2, 3, or 4) or afamin.^[9] By contrast, another liposoluble vitamin, vitamin A (retinol) is probably absorbed by cells through the receptor of retinol-binding protein.

In conclusion, the carriers can be divided into two major families, depending in whether or not the enhancement of uptake is associated with cell-type-specific targeting. It should be noted that the nature of the cargo certainly has an impact on the effectiveness of delivery and toxicity; these likely depend on the size, charge, and other molecular characteristics and the nature of the linkage used for conjugation.

2.2. Nature of the cargo

Different oligonucleotide-based therapeutic strategies have been described. Although some clearly have great potential, the major limiting factor remains delivery. siRNAs, antagonists

and antisense oligonucleotides as splicing modulators, are among the most promising approaches currently being clinically evaluated. We will point out some characteristics that are important to consider in view of delivery strategies, especially target localization and the chemistry of the cargo. Of note, these three types of oligonucleotide-based strategies function by totally distinct mechanisms of action and involve the use of different types of chemically modified short nucleic acids (Figure 1).

2.2.1. Small interfering RNAs: The discovery that short duplex RNAs can be used to efficiently knock-down gene expression through degradation of the complementary messenger RNA has had a tremendous impact on basic and applied research. This post-transcriptional inhibition by exogenous RNAs takes advantage of a natural cellular process called RNA interference (RNAi^[10]), the effector RNAs are called small interfering RNAs or siRNAs. Synthetic siRNAs are short duplexes, 20–30 base pairs

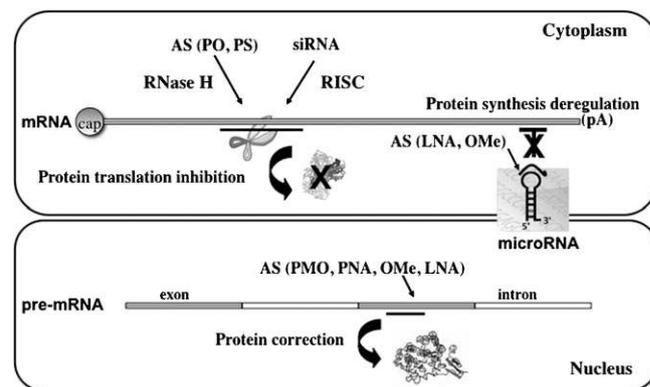


Figure 1. Mechanisms of antisense (AS) and siRNA oligonucleotides. The mechanisms of action, the RNA targets (mRNA, pre-mRNA, or miRNA), the chemical nature of the oligonucleotide and the resulting expected activities are schematically depicted. Phosphodiester (PO) or phosphorothioate (PS) linkages are necessary when RNase H activation is required. The locked nucleic acid (LNA), peptide nucleic acid (PNA), phosphorodiamidate morpholino backbones, or certain sugar modifications like the 2'-O-methyl (OMe) impart nuclease resistance to the oligonucleotide and inhibit RNase H-induced RNA cleavage.

in length, with 3' dinucleotide overhangs, to mimic naturally generated products in RNAi. Direct sequence-specific cleavage of the target messenger RNA occurs when the siRNA is perfectly complementary; the RNA-induced silencing complex (RISC) is responsible for this cleavage and the subsequent RNA degradation.

The very rapid advance of the field clearly illustrates the potential of the siRNA approach. Only one decade after its discovery, siRNAs are being evaluated in clinical trials. Some limitations have been recently highlighted. These include off-target effects due to sequestration of the RNAi machinery, deregulation of associated processes, and induction of type I interferon responses by some sequence motifs.^[11,12] However strategies are emerging to overcome these problems including the use of chemically modified siRNAs.^[13]

Introduction of chemical modifications has several advantages including an increase in stability in physiological media, reduction of off-target effects and improvement of efficacy.^[14] Among the most widely used modifications are the selective addition of phosphorothioate linkages or 2' ribose modifications, such as 2'-*O*-methyl, and conjugation to agents that improve delivery (see sections 3 and 4). Usually the nature and location of modifications are chosen to be compatible with siRNA activity (i.e., inclusion and processing by the RISC complex).^[15,16]

2.2.2. Splicing modulators: A promising application of antisense technology is the exon-skipping approach. It is based on the targeting of the premessenger RNA with a chemically modified oligonucleotide or analogue that does not induce pre-mRNA cleavage but does interfere with the splicing machinery. This leads alteration of the splicing pattern of the targeted pre-mRNA and results in production of an mRNA encoding a functional protein. Pioneering experiments in Richard Kole's laboratory were performed with anti- β -globin oligonucleotides^[17] and have now been extended to a series of relevant therapeutic targets.

In particular, this approach has been successfully validated in the last few years in cellular and in vivo models of muscular dystrophy (MD). Three phase I–II clinical trials are now underway in the Netherlands (by Prosensa with a 2'-*O*-methyl phosphorothioate oligonucleotide, PRO051 and PRO044) and in the UK (by AVI BioPharma with a phosphorodiamidate morpholino, AVI4658) to treat Duchenne's muscular dystrophy (DMD) patients (for a review see ref. [18]). In these cases, the target is either in exon 51 of dystrophin pre-mRNA, the most frequently mutated region in the DMD gene, or in exon 44 (for PRO044) and oligonucleotide treatment results in exon skipping and production of near wild-type levels of functional protein.

Muscular dystrophies, and in particular DMD, are very appropriate systems for an exon-skipping approach. Mutations in the DMD gene result in loss of functional dystrophin and progressive loss of muscle strength. However, some specific truncated forms of the dystrophin protein maintain a certain level of functionality and have obvious therapeutic benefit. The exon-skipping approach induces production of truncated, partly functional proteins and appears to be an interesting al-

ternative to more classical gene therapy strategies that are aimed at introducing a mini-DMD gene.

The particularity of this approach is that the antisense molecule is chemically modified such that RNaseH cleavage of the target does not occur. The chemistries that are appropriate and widely used are 2'-modified sugars (such as 2'-*O*-methyl) and backbone modifications like locked nucleic acids (LNAs), phosphorodiamidate morpholino (PMO), and peptide nucleic acids (PNAs). Oligonucleotides modified with all these chemistries exhibit efficient exon-skipping activity in cells and in mouse models. However, high doses are required in vivo and, of great concern when used in DMD patients, cardiac muscle seems to be refractory to the antisense therapy when the antisense molecule is administered in its naked form. It was recently shown that both potency and cardiac delivery can be improved by conjugation to CPP (see details in Section 3).^[19]

2.2.3. Antagomirs: Finally, there is another interesting application for antisense oligonucleotides, namely the inhibition of microRNA (miRNA) functions. Antisense molecules directed against miRNA are often called antagomirs. miRNAs inactivate translation of specific mRNAs and are involved in many biological processes and pathologies. miRNAs have been successfully targeted by antisense molecules in cell culture and in vivo. The result is inhibition of miRNA post-transcriptional silencing and de-repression of the corresponding gene. Generally, the antagomirs are 22–25 nt long and must be appropriately modified. Oligonucleotides containing 2'-*O*-methyl or LNA with some phosphorothioate linkages are highly active.^[20,21] Of note, the two cited chemistries might not function in the same way since antagomirs modified with 2'-*O*-methyl induce miRNA degradation and those modified with LNA appear to sequester the miRNA. Moreover, the exact mechanism of action of the antagomirs remains to be fully established.

miRNAs have been implicated in various diseases. For example, miR-122 is known to have a role in cholesterol metabolism and in hepatitis C virus (HCV) replication, and in 2008 Santaris initiated the first clinical trial with an LNA-modified anti-miR molecule against miR-122 for the treatment of hepatitis C. More recently, the role of miR-206 in the progression of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) was demonstrated, and thus this miRNA is a potential target for the treatment of this neuromuscular disease.^[22]

3. Nontargeted Delivery and Mechanisms

A large variety of molecules have been evaluated for their ability to enhance oligonucleotide delivery, either used in complexes or directly attached to the cargo. We will focus on promising results obtained with CPP conjugates and derivatives.

3.1. CPPs and chemical variants

Over the last two decades, an increasing number of natural and synthetic CPPs have been used to deliver cargo into the cell cytoplasm and nucleus both in vitro and in vivo. Some of the most commonly used CPPs are shown in Table 1. Among

the first examples of designed sequences were the polyarginines and transportan. Most CPPs are cationic, and arginine residues, and more specifically guanidinium groups, are often important for activity. This is probably due to the ability of the guanidinium groups to form hydrogen bonds with sulfate, phosphate, and carboxylate groups in the cell membrane, consequently producing ion-pair complexes capable of diffusing into and through the membrane. The discovery that the guanidinium residues of arginine are the essential ingredients of a peptide's ability to enter cells has allowed the design of a range of guanidinium-rich synthetic analogues.^[23] Based on the encouraging results obtained with arginine-rich peptides for oligonucleotide and PNA delivery, guanidinium groups have been introduced along the backbone of PNAs^[24] and oligonucleotides,^[25] and enhanced cellular uptake was demonstrated. Work to design novel CPPs with improved delivery properties is on-going (see examples in Section 3.3).

3.2. Mechanisms of CPP-mediated delivery

It appears that CPPs can access the cell by two distinct routes: direct process involving translocation of the lipid bilayer and energy-dependent vesicular mechanisms, collectively referred to as endocytosis. Most cationic CPPs bind to cell-associated glycosaminoglycans and are internalized by endocytosis with eventual release from the endosomes to the cytoplasm, although the detailed mechanisms remain controversial. Results from a large number of studies suggest that the mechanism of endocytic uptake for a CPP is strongly dependent on cell type and on the attached cargo.

Endocytosis, which includes phagocytosis and pinocytosis, is a regulated process used by cells to internalize solutes and fluids from the extracellular matrix. Phagocytosis is restricted to specialized cells like macrophages and leukocytes. In contrast, pinocytosis occurs in all mammalian cell types through at least three different endocytic pathways. Clathrin-mediated endocytosis is the major pathway and the best-characterized one. It involves strong binding of a ligand to a specific cell surface receptor resulting in the clustering of the ligand–receptor complexes in coated pits on the plasma membrane, formed by the assembly of clathrin. The coated pits invaginate and pinch off the plasma membrane to form intracellular clathrin-coated vesicles. Second, caveolin-dependent endocytosis involves small, hydrophobic microdomains that are rich in cholesterol and glycosphingolipids. Ligands associate with the cell membrane and then become trapped in caveolea, which then bud off the membrane and form caveosomes. Cholesterol is required for caveolar uptake. Third, macropinocytosis involves the formation of large endocytotic vesicles of irregular size and shape, generated by actin-driven invagination of the plasma membrane.

Controversies still exist concerning whether the major endocytic pathway involved in internalization of cationic CPPs is macropinocytosis^[26] or clathrin-mediated.^[27] It is noteworthy that a single CPP can simultaneously exploit multiple modes of uptake to enter cells. Recently, this issue was explored in depth for cationic CPPs.^[28,29] In these detailed studies it was

found that TAT exploits macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, and caveolae/lipid-raft-mediated endocytosis to enter cells. However, the molecules that TAT binds on the cell surface to induce macropinocytosis have not been yet identified, and there is no data concerning how escape from the endosome into the cytoplasm is accomplished.

Finally it must be mentioned that results on uptake mechanisms must be carefully examined, because some pharmacological agents used to probe specific mechanisms of endocytosis can interfere with endocytic pathways as well as other cellular properties. There is the need to develop more direct approaches, for example by using antibodies to localize specific endomembrane compartments. Moreover, carrier–cargo internalization should be evaluated by a robust biological assay that provides direct evidence and measurement of the delivery of the transported oligonucleotide to its intracellular site of action.

3.3. Examples of CPP conjugates

CPPs have been extensively used to deliver oligonucleotides or analogues, mainly those with uncharged backbones (PMO, PNA) rather than anionic antisense oligonucleotides or siRNAs. Today one of the challenges is to design CPP conjugates that efficiently escape the endocytic vesicles to deliver the cargo in the cytoplasm upon entry.

Neutral oligonucleotide analogues have been successfully used in exon-skipping approaches (see Section 2.2.2). In this case, nuclear delivery is necessary because pre-mRNA processing occurs in the nucleus. The splicing-correction assay originally developed by Kole's laboratory is a highly reliable means to evaluate nuclear delivery. It is a positive-read-out assay, and only the presence of specific steric-blockers within the nucleus of viable cells allows correct splicing. Use of this sensitive splicing redirection model allowed optimization of CPP conjugate technology for delivery of PNA and PMO into the nuclear compartment (reviewed in ref. [30]). Recently, improvements in antisense-mediated exon-skipping were described for conjugates of PNA^[27] and PMO oligomers with cationic CPPs relative to unconjugated oligomers. Impressively, PMOs conjugated to an arginine-rich CPP and systemically delivered resulted in exon skipping and increased production of dystrophin in almost all tissues, including heart.^[19] Such results open very promising avenues for therapeutic applications.

Antisense oligonucleotides and siRNAs are anionic cargos and far fewer data are available^[31–33] on CPP conjugates of these molecules. To overcome charge neutralization and inactivation of the CPP by the anionic cargo (for an siRNA, around 40 negative charges), we will mention a novel interesting strategy that is based on complex formation: The CPP was fused to a double-stranded RNA-binding domain (DRBD) that binds siRNAs with high affinity.^[34] Binding of CPP-DRBD to siRNAs with a 4:1 stoichiometry results in charge masking and efficient delivery of the siRNA into various primary and transformed cells. Encouraging results were also described in vivo: Transgenic mice expressing luciferase in the nasal and tracheal pas-

sages were treated intranasally with CPP–DRBD and anti-luciferase siRNA and significant luciferase inhibition was observed.

In conclusion, future studies on endosomal entrapment and further understanding of uptake mechanisms and the toxicity of CPP conjugates will instruct the design of next generation of CPPs having an improved intracellular trafficking and a higher therapeutic index.

4. Targeted Delivery and Mechanisms

The ultimate challenge in drug delivery is to target the right compartment in the right cells. A promising strategy is based on oligonucleotide delivery via receptor-mediated uptake. Various receptors are preferentially expressed on particular cell types, allowing us to envision cell-type-specific targeting. An oligonucleotide can be linked to a targeting moiety that binds to a cell-surface receptor that can undergo internalization. Most of the time, these conjugates are more efficient than the non-targeted ones and the active concentration is much lower, probably due to different uptake mechanisms and the intracellular trafficking pathways. This targeting approach greatly minimizes off-target effects. Today, a limited number of receptors have been targeted for oligonucleotide delivery to specific cell types, mainly lipoprotein receptors, integrins, and tyrosine kinase receptors. We will focus on some recent promising examples using small organic molecules, peptides, and aptamers (Figure 2).

4.1. Small organic molecules and peptides

4.1.1 Cholesterol-mediated targeting: A “classical” strategy is the conjugation of a drug with a small lipophilic molecule. The prototypical lipophilic carrier for short nucleic acids is chole-

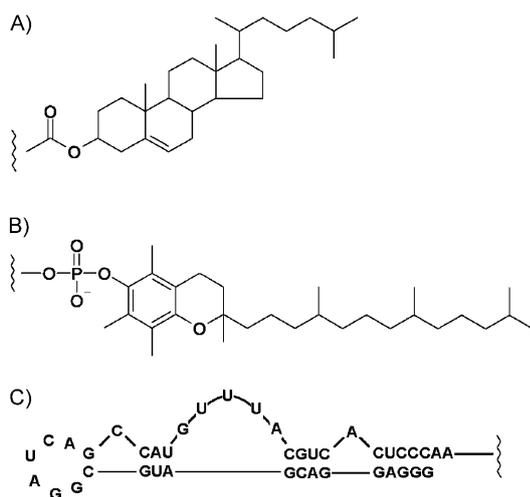


Figure 2. Targeted delivery strategies for therapeutic oligonucleotides. Examples of targeting moieties that have been attached to siRNAs are shown. A) Cholesterol groups have been linked to the 3'-ends of the sense strands of siRNA and to antagomir.^[38,20] B) Vitamin E (α -tocopherol) has been conjugated to the 5'-end of the antisense strand of siRNA.^[40] C) Aptamers have been fused to the 5'-end of the sense strand of siRNA; here an anti-PMSA aptamer is depicted.^[53]

sterol; however a variety of cholesterol derivatives and other chemicals have been developed.^[35] For example, conjugation to the lipophilic triphenylphosphonium cation allows cell uptake of a PNA conjugate and, interestingly, the accumulation of the PNA conjugate in the mitochondria.^[36] Recent studies have demonstrated the utility of cholesterol–siRNA conjugates. Cholesterol was conjugated to the 3'-end of the sense strand of an siRNA targeting apolipoprotein B (apoB) mRNA.^[37] This conjugate was the first example of siRNA activity in vivo after systemic administration, and this was likely due to improved pharmacological properties compared to unconjugated siRNAs (slower elimination half-life and plasma clearance). After the administration of 50 mg kg⁻¹ of conjugate to mice, the conjugate was found in liver and jejunum cells and apoB mRNA and protein levels were significantly decreased as was the level of total serum cholesterol.^[37] Conjugation of cholesterol was also successfully applied to an antagomir selective for miR-122, an abundant liver-specific miRNA;^[20] 240 mg kg⁻¹ of the conjugate induced a total loss of miR-122 signal in mice.

More recently, the delivery mechanism of lipophilic siRNAs, including cholesterol conjugates, was precisely characterized.^[38] This work demonstrated that it was possible to enhance delivery and silencing activity of cholesterol–siRNAs by approximately tenfold by pre-forming a complex with HDL or LDL before administration. An interesting mechanism of delivery for this complex was proposed: HDL or LDL-cholesterol–siRNA complexes bind to cells that harbor HDL or LDL receptors and the cholesterol–siRNA conjugate enters the cells through Sid1 (Systemic RNAi Deficient-1), a membrane transporter the homologue of which is essential for systemic RNAi activity in *C. elegans*. This model is based on data obtained in mice or cell-based systems that lack the receptor or transporter. This potential mechanism is consistent with the targeting specificity of delivery observed for each complex: LDL-bound cholesterol siRNAs are mainly taken up by the liver, which is known to overexpress the LDL receptor, and HDL-bound cholesterol siRNAs were taken up by various tissues (liver, kidney, ovary, adrenal) that highly express the SR-BI receptor known to facilitate cholesterol uptake from HDL into cells. Of note, cholesterol–siRNAs are not unique in their ability to bind lipoproteins that target them to specific cell types; other highly lipophilic conjugates containing long-chain fatty acids (\geq C18) also provide cell-type specific uptake. Finally, the SR-BI targeting by HDL was also exploited and validated in experiments by using complexes, namely DOTAP–cholesterol liposomes complexed with apolipoprotein A-I, a component of HDL.^[39] Formulated with siRNAs targeting hepatitis B virus (HBV), the particles targeted SR-BI present on hepatocytes and a single treatment induced an efficient and persistent antiviral effect even at low doses (< 2 mg kg⁻¹) in mice carrying replicating HBV.

4.1.2 Vitamin-mediated targeting: α -Tocopherol, one of the eight natural isomers of vitamin E, was conjugated to the 5'-end of the antisense strand of an siRNA targeting apoB mRNA.^[40] When intravenously injected at 2 mg kg⁻¹, the conjugate was absorbed into the liver and led to apoB mRNA silencing in this tissue. Furthermore, decreased serum levels of triglycerides and cholesterol and increased lipid droplets in the liver

were observed in the treated mice. The conjugate did not induce production of interferon α and β and did not affect blood cell counts; this suggests that the conjugate did not trigger an immune response.

Interestingly in this same study, 2 mg kg^{-1} of the same siRNA conjugated to cholesterol was inactive in the livers of mice, highlighting differences in circulation and/or uptake between α -tocopherol and cholesterol. Cell culture experiments show the necessity of serum for uptake of α -tocopherol conjugates by hepatocytes, suggesting that these conjugates are bound by serum proteins, perhaps lipoproteins, and enter cells through receptors for these serum proteins. It is likely that the distribution of cholesterol and α -tocopherol among serum proteins is different and results in distinct cell-type specificities. For cholesterol conjugates, LDL, HDL, and albumin are bound. It is known that α -tocopherol interacts with serum proteins, and these proteins might play a role in the conjugate uptake. The precise delivery pathway of the vitamin conjugate remains to be elucidated.

Importantly, vitamin-based delivery is not restricted to the previous example. Another liposoluble vitamin, vitamin A (retinol), was successfully used for siRNA delivery. Vitamin A is efficiently taken up by hepatic stellate cells, most likely through retinol-binding proteins (RBP). siRNAs encapsulated in vitamin A-coupled liposomes were preferentially delivered to these cells^[41] through RBP receptor-mediated uptake. The siRNA used targeted heat shock protein (gp46); gene silencing was observed in hepatic stellate cells and liver cirrhosis in rats treated with 0.75 mg kg^{-1} of the conjugate.

4.1.3. RGD-mediated integrin targeting: A commonly used approach to target tumor cells or tumor vasculature is to exploit $\alpha_v\beta_3$ integrin, which is expressed at high levels on the surface of many cancer cells.^[42] The RGD peptide binds to $\alpha_v\beta_3$ integrin and has been widely used to decorate nanoparticles for oligonucleotide delivery. RGD-oligonucleotide conjugates are internalized through $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated endocytosis.^[43,44]

4.1.4. Tyrosine kinase receptor targeting: The use of a peptide analogue of a ligand for a cell surface receptor is a way to provide cell-type specificity. For example an N-terminal D-peptide analogue of IGF-1 has been successfully used to deliver PNA into IGF-1R overexpressing cells, including MCF7 breast cancer cells; almost no uptake was observed with control cells or control peptide.^[45,46] When additionally conjugated to a γ -emitting radiolabel, the radiolabel-PNA-peptide chimera allowed noninvasive scintigraphic imaging of oncogene messenger RNA in solid tumors.^[47]

4.1.5. RVG-mediated CNS targeting: A very impressive study showed that it is possible to deliver siRNA to the central nervous system (CNS) and overcome the blood-brain barrier. An siRNA directed against the Japanese encephalitis virus was selectively delivered into the CNS by systemic intravenous injection when conjugated to a peptide derived from rabies virus glycoprotein (RVG).^[48] RVG binds to the acetylcholine receptor present on neural cells. Intravenous treatment with the RVG-R9-siRNA (where R stands for arginine) conjugate protected mice from viral encephalitis.

4.1.6. Non-cell-surface receptor-based targeting approaches: Other strategies that do not involve cell-surface receptors have been proposed, and two examples will be mentioned to illustrate these original approaches. In the presence of Zn^{2+} , the uptake of a PNA linked to a terpyridine moiety that is able to coordinate this metal ion into cells is enhanced.^[49,50] Because zinc is a metal with a specific cell-type and tissue distribution, this observation raises the possibility of cell-type-specific targeting by using an appropriate conjugate. This interesting targeting concept has not yet been validated by a biological read-out; the published uptake data is based on fluorescence measurements.

The second targeting approach exploits the properties of cell-specific nuclear receptors to translocate to the nucleus following specific hormone binding.^[51] Dihydrotestosterone, a biologically active form of testosterone known to bind to the androgen receptor (AR), was attached to an antigene PNA directed against *c-myc* gene. The resultant conjugate was able to enter prostate cancer cells expressing *myc* and to inhibit MYC transcription only in AR-expressing cells. The principle is interesting and should be further evaluated for nuclear targets (DNA or pre-mRNA).

4.2. Aptamers

Aptamer-based delivery is a non-protein-based alternative to antibodies. A number of studies have identified nucleic acids, including RNAs, called aptamers that are able to specifically and tightly bind to a protein of interest. Aptamers are usually identified by using a SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) type approach. An aptamer targeting a particular cell surface protein can be chemically synthesized and attached to nucleic acid cargo to enhance cell uptake. Aptamer synthesis is compatible with large-scale synthesis and GMP quality controls. Aptamers themselves can also exhibit inhibitory activity that can be exploited to improve efficiency. We will describe promising examples of the aptamer-based delivery approach and also a very interesting recent example based on a related strategy, the use of a CpG oligonucleotide as a targeting moiety.

Prostate cells have been targeted by an aptamer that recognizes prostate-specific membrane antigen (PMSA).^[52] PMSA is overexpressed on prostate cancer cells and tumor vascular endothelium. Two siRNAs targeting survival genes (*polo-like kinase-1*, *PLK1*, and *BCI2*) were "fused" to a PMSA aptamer. The design of the chimera was compatible with binding of the RISC to the appended siRNA. The first generation of chimera inhibited growth of prostate cancer xenografts following intratumoral injection. An optimized chimera showed potent anti-tumor activity after systemic injection into mice.^[53] The optimization reduced the aptamer size and involved chemical modifications, including 2'-fluoropyrimidines to increase in vivo stability and decrease immunotoxicity and a terminal 20 kDa PEG to increase serum retention. The optimized conjugate exhibited enhanced silencing activity and specificity.

More recently, an anti-gp120 aptamer was attached to an siRNA designed to inhibit HIV infection by targeting the enve-

lope glycoprotein.^[54] The composition of the chimera was novel with two moieties that are able to inhibit HIV replication. The aptamer not only facilitates uptake, but also inhibits HIV infection by blocking the interaction between gp120 and CD4, and the siRNA knocks-down tat/rev expression. This chimera design resulted in greater efficacy than either component alone. The chimera design was optimized both for increased RISC activity and also, interestingly, for potential multiplexing.^[55] A 16-nucleotide-long GC-rich sequence was introduced at the 3'-end of the aptamer to allow the noncovalent conjugation of different siRNAs with the aptamer.

A recent study investigated a related approach based on conjugation between an siRNA and a CpG oligonucleotide rather than an aptamer. The objective was to deliver siRNA specifically to immune cells and to improve the antitumor response.^[56] The siRNA antisense strand was linked to an immunostimulatory CpG oligonucleotide that is an agonist of the toll-like receptor 9 (TLR9) present in immune cells. Following receptor binding, it induces various immune responses via endosomal TLR activation.^[57] In addition, it seems to be efficiently internalized by various antigen-presenting cells (dendritic cells, macrophage, and B cells) likely by phagocytosis, although the uptake mechanism remains to be fully determined.^[58] The siRNA portion targets the immune suppressor gene *Stat3* and then silences immune checkpoint and oncogenic genes, allowing an antitumor immune response. The TLR agonist–siRNA conjugate is an elegant example of combining multiple activities in a single molecule.

Finally we will mention an original non-conjugate-based targeting approach. It is an antibody-based delivery method that allowed successful cell-type specific delivery. It makes use of protamine, a positively charged protein that interacts with anionic siRNAs and can be attached to other proteins, such as Fabs (fragment antigen binding). Protamine–antibody fusion proteins were designed to deliver siRNA.^[59] The fusion protein includes the protamine coding sequence linked to the C terminus of a single-chain antibody. An anti-HIV-1 envelope or an anti-ErbB-2 antibody provided cell-type specific delivery of siRNA to HIV-1 infected cells or ErbB-2-expressing cells, respectively, after systemic administration. Recently, the human integrin lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) was successfully targeted by a similar approach by using a LFA-1 directed antibody-protamine fusion proteins to deliver siRNA specifically to primary lymphocytes, monocytes and dendritic cells after intravenous injection.^[60] Interestingly, in this study, activation-dependent conformational variants could be specifically recognized that allows the targeting of activated leukocytes. This approach is very promising, although some technical issues remain.

5. Conclusion and Perspectives

Significant advances have been made in the delivery of therapeutic oligonucleotides and their analogues, but obstacles still exist to clinical efficacy. An ideal delivery system must be effective, safe, and reliable; it should protect the cargo during circulation and deliver a sufficient amount into the correct cellular

compartments in cells of interest. Targeted delivery strategies should fulfill these conditions following systemic delivery.

We have focused on monomolecular oligonucleotide conjugates in this review. This type of conjugate, like a conventional drug, consists of a well-defined molecular entity. In parallel to direct conjugation of the nucleic acid cargo, strategies based on formulation by using lipid-, polymer-, or peptide-based delivery systems are being developed^[29] and have been briefly mentioned here to illustrate some specific aspects. These formulations are of high molecular weight, carry a large number of cargo drug molecules, and can be decorated with multiple copies of the targeting ligand; thus increasing the effective local concentration and efficiency. With this in mind, researchers have designed multivalent carriers based on covalent conjugation (e.g., see refs. [44] or [61]), and these strategies should be further explored.

Significant progress has been made recently in the targeted delivery of nucleic acid-based drugs, including the very elegant approaches described here. The spectrum of tissues that can be targeted must be enlarged, however, in order to treat a broader spectrum of diseases. Defining the appropriate targeted delivery system should allow the use of low doses of active cargo, which will translate into improved safety by reducing off-target toxicity.

To illustrate that the identification of appropriate chemistries is crucial for the improvement of existing delivery approaches, we will conclude with two very promising works published very recently. One concerns siRNA-directed liver gene silencing in mice.^[62] Love et al. have developed a lipidoid formulation that increased siRNA efficacy by 2–3 orders compared to a previously described lipid-based formulation. The activity was observed at around $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ of siRNA, whereas previously reported *in vivo* activities have been in the $1\text{--}10 \text{ mg kg}^{-1}$ range. The other one concerns the first phase I clinical trial involving systemic administration of siRNA.^[63]

In summary, significant advances have been made in oligonucleotide delivery, but more progress must be made before the promise of nucleic acid-based therapeutics is realized. In particular, the development of novel chemical carriers with improved properties will require a better understanding of internalization mechanisms. We expect that biophysical methods will be used to study the interactions at the atomic level and then rationally define small mimics or new chemical compounds that can be used to deliver drugs. The delivery strategy will always depend on the type of oligonucleotide or analogue, on the disease of interest, and on which tissue must be targeted.

Acknowledgements

Funding was from Inserm, CNRS, Museum national d'Histoire naturelle and ANR. F.M. is a doctoral fellow supported by the French Ministry for Research.

Keywords: cell-penetrating peptides • cholesterol • drug delivery • oligonucleotide conjugates • oligonucleotides • siRNA

- [1] R. Juliano, M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4158–4171.
- [2] D. Castanotto, J. J. Rossi, *Nature* **2009**, *457*, 426–433.
- [3] H. Lonnberg, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1065–1094.
- [4] A. Prochiantz, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 400–406.
- [5] A. D. Frankel, D. S. Bredt, C. O. Pabo, *Science* **1988**, *240*, 70–73.
- [6] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
- [7] M. Hansen, K. Kilk, U. Langel, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 572–579.
- [8] Z. Ma, J. Li, F. He, A. Wilson, B. Pitt, S. Li, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 755–759.
- [9] J. M. Zingg, *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 400–422.
- [10] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [11] A. A. Khan, D. Betel, M. L. Miller, C. Sander, C. S. Leslie, D. S. Marks, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 549–555.
- [12] A. D. Judge, V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 457–462.
- [13] A. L. Jackson, P. S. Linsley, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 57–67.
- [14] M. A. Behlke, *Oligonucleotides* **2008**, *18*, 305–319.
- [15] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, A. Khvorovva, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 326–330.
- [16] K. Ui-Tei, Y. Naito, S. Zenno, K. Nishi, K. Yamato, F. Takahashi, A. Juni, K. Saigo, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 2136–2151.
- [17] Z. Dominski, R. Kole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8673–8677.
- [18] A. Aartsma-Rus, G. J. van Ommen, *Eur. J. Hum. Genet.* **2010**, *18*, 146–153.
- [19] B. Wu, H. M. Moulton, P. L. Iversen, J. Jiang, J. Li, C. F. Spurney, A. Sali, A. D. Guerron, K. Nagaraju, T. Doran, P. Lu, X. Xiao, Q. L. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14814–14819.
- [20] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [21] J. Elmen, M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup, S. Kauppinen, *Nature* **2008**, *452*, 896–899.
- [22] A. H. Williams, G. Valdez, V. Moresi, X. Qi, J. McAnally, J. L. Elliott, R. Bassel-Duby, J. R. Sanes, E. N. Olson, *Science* **2009**, *326*, 1549–1554.
- [23] M. Zorko, U. Langel, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 529–545.
- [24] P. Zhou, M. Wang, L. Du, G. W. Fisher, A. Waggoner, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6878–6879.
- [25] G. Deglane, S. Abes, T. Michel, P. Prevot, E. Vives, F. Debart, I. Barvik, B. Lebleu, J. J. Vasseur, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 684–692.
- [26] I. M. Kaplan, J. S. Wadia, S. F. Dowdy, *J. Controlled Release* **2005**, *102*, 247–253.
- [27] G. D. Ivanova, A. Arzumanov, R. Abes, H. Yin, M. J. Wood, B. Lebleu, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 6418–6428.
- [28] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, *Traffic* **2007**, *8*, 848–866.
- [29] M. C. Morris, S. Deshayes, F. Heitz, G. Divita, *Biol. Cell* **2008**, *100*, 201–217.
- [30] B. Lebleu, H. M. Moulton, R. Abes, G. D. Ivanova, S. Abes, D. A. Stein, P. L. Iversen, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 517–529.
- [31] A. Astriab-Fisher, D. Sergueev, M. Fisher, B. R. Shaw, R. L. Juliano, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 744–754.
- [32] J. J. Turner, S. Jones, M. M. Fabani, G. Ivanova, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Blood Cells Mol. Dis.* **2007**, *38*, 1–7.
- [33] A. W. Fraley, B. Pons, D. Dalkara, G. Nullans, J. P. Behr, G. Zuber, *J Am Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10763–10771.
- [34] A. Eguchi, B. R. Meade, Y. C. Chang, C. T. Fredrickson, K. Willert, N. Puri, S. F. Dowdy, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 567–571.
- [35] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975–4977.
- [36] A. Muratovska, R. N. Lightowlers, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, R. A. Smith, J. A. Wilce, S. W. Martin, M. P. Murphy, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1852–1863.
- [37] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliensky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173–178.
- [38] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliensky, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1149–1157.
- [39] S. I. Kim, D. Shin, T. H. Choi, J. C. Lee, G. J. Cheon, K. Y. Kim, M. Park, M. Kim, *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 1145–1152.
- [40] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 734–740.
- [41] Y. Sato, K. Murase, J. Kato, M. Kobune, T. Sato, Y. Kawano, R. Takimoto, K. Takada, K. Miyaniishi, T. Matsunaga, T. Takayama, Y. Niitsu, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 431–442.
- [42] D. G. Stupack, D. A. Cheresch, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2004**, *64*, 207–238.
- [43] M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, Z. B. Li, X. Chen, J. Trejo, M. Fisher, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 2764–2776.
- [44] H. Kang, M. R. Alam, V. Dixit, M. Fisher, R. L. Juliano, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2182–2188.
- [45] S. Basu, E. Wickstrom, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 481–488.
- [46] G. Cesarone, O. P. Edupuganti, C. P. Chen, E. Wickstrom, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1831–1840.
- [47] X. Tian, M. R. Aruva, W. Qin, W. Zhu, E. R. Sauter, M. L. Thakur, E. Wickstrom, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 70–79.
- [48] P. Kumar, H. Wu, J. L. McBride, K. E. Jung, M. H. Kim, B. L. Davidson, S. K. Lee, P. Shankar, N. Manjunath, *Nature* **2007**, *448*, 39–43.
- [49] A. Füssli, A. Schleifenbaum, M. Göritz, A. Riddell, C. Schultz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5986–5987.
- [50] A. Mokhir, R. Krämer, H. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6208–6209.
- [51] L. C. Boffa, S. Scarfi, M. R. Mariani, G. Damonte, V. G. Allfrey, U. Benatti, P. L. Morris, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2258–2262.
- [52] J. O. McNamara II, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1005–1015.
- [53] J. P. Dassie, X. Y. Liu, G. S. Thomas, R. M. Whitaker, K. W. Thiel, K. R. Stockdale, D. K. Meyerholz, A. P. McCaffrey, J. O. McNamara, 2nd, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 839–849.
- [54] J. Zhou, H. Li, S. Li, J. Zaia, J. J. Rossi, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1481–1489.
- [55] J. Zhou, P. Swiderski, H. Li, J. Zhang, C. P. Neff, R. Akkina, J. J. Rossi, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3094–3109.
- [56] M. Kortylewski, P. Swiderski, A. Herrmann, L. Wang, C. Kowolik, M. Kujawski, H. Lee, A. Scuto, Y. Liu, C. Yang, J. Deng, H. S. Soifer, A. Raubitschek, S. Forman, J. J. Rossi, D. M. Pardoll, R. Jove, H. Yu, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 925–932.
- [57] A. M. Krieg, *Oncogene* **2008**, *27*, 161–167.
- [58] E. Latz, A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, D. T. Golenbock, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 190–198.
- [59] E. Song, P. Zhu, S. K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, W. A. Marasco, J. Lieberman, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 709–717.
- [60] D. Peer, P. Zhu, C. V. Carman, J. Lieberman, M. Shimaoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4095–4100.
- [61] T. C. Chu, K. Y. Twu, A. D. Ellington, M. Levy, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e73.
- [62] K. T. Love, K. P. Mahon, C. G. Levins, K. A. Whitehead, W. Querbes, J. R. Dorkin, J. Qin, W. Cantley, L. L. Qin, T. Racie, M. Frank-Kamenetsky, K. N. Yip, R. Alvarez, D. W. Sah, A. de Fougères, K. Fitzgerald, V. Koteliensky, A. Akinc, R. Langer, D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1864–1869.
- [63] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature* **2010**, *464*, 1067–1070.

Received: March 3, 2010

Published online on June 23, 2010

2.2.4 L'Internalisation Photochimique (PCI)

Les stratégies de vectorisation se heurtent souvent à une séquestration de l'ON dans des structures cellulaires de type endosome et différentes approches, notamment chimiques, ont été développées pour contourner ce phénomène. Une de ces stratégies, nommée PCI, a été exploitée au cours de ce travail de thèse et est décrite dans le paragraphe suivant.

L'internalisation photochimique ou PCI (pour Photochemical Internalization) est une stratégie permettant de provoquer la sortie des endosomes de molécules d'intérêt qui y sont souvent prisonnières. Le principe de la PCI repose sur un composé photosensible localisé dans les membranes des endosomes et qui peut en induire la rupture après irradiation. Un composé photosensible est une molécule qui peut absorber de l'énergie lors de son irradiation à une longueur d'onde donnée et passer ainsi d'un état fondamental à un état excité. La molécule en son état excité peut alors transférer cette énergie et initier des réactions photochimiques notamment *via* la production d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (Figure 2.3 A). L'oxygène singulet est un agent oxydant très puissant possédant un temps de vie très court (moins de 0.1ms) et un faible rayon de diffusion (entre 10 et 20nm) dans la cellule (Hogset et al., 2004).

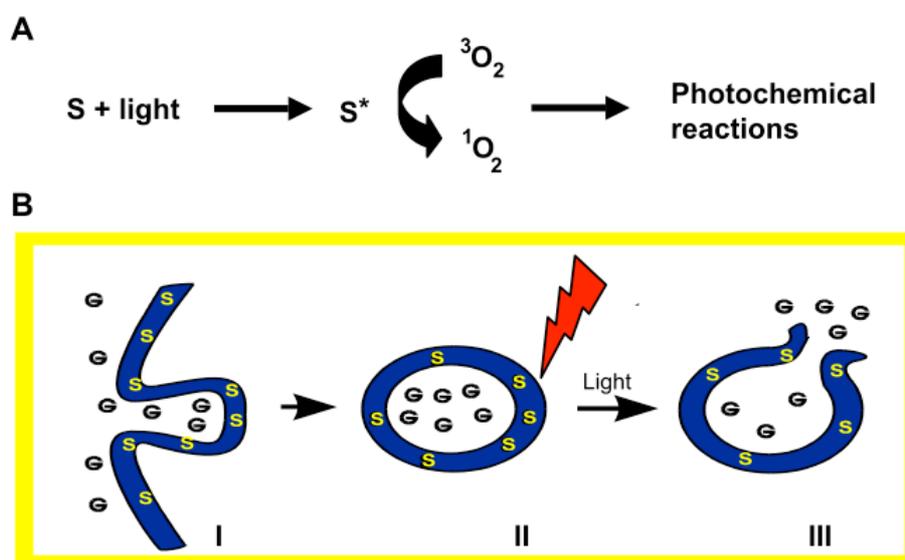


Figure 2.3 : Réactions photochimiques (A) et principe de la PCI (B) (Hogset et al., 2004)

S : composé photosensible, S* : composé photosensible à l'état excité
G : molécule à internaliser, en bleu : membrane plasmique (I) ou endosomale (II et III)

Le protocole classique de la PCI consiste à traiter les cellules par le composé photochimique et la molécule à internaliser, qui seront tous deux endocytés. L'irradiation des cellules à la longueur d'onde pertinente provoque alors la production d'agents oxydants tels que $^1\text{O}_2$ qui, s'ils sont générés à proximité des membranes endosomales, peuvent infliger des dommages aux protéines et/ou aux lipides qui les composent et ainsi libérer le contenu des endosomes dans le cytoplasme (Figure 2.3 B).

Les deux molécules photosensibles les plus utilisées pour effectuer la PCI sont des porphyrines, et plus précisément TPPS_{2a} (méso-tétraphénylporphyrine avec deux groupes sulfonate sur deux des cycles phényle) et AlPcS_{2a} (phtalocyanine d'aluminium avec deux groupes sulfonate sur deux des cycles adjacents). Ces composés sont de bons agents PCI car ils sont amphiphiles et s'insèrent dans les membranes, ils peuvent ainsi être internalisés dans la cellule lors de l'endocytose et générer ensuite des dommages aux membranes des endosomes de manière efficace. La longueur d'onde d'absorption diffère cependant pour ces deux composés, puisqu'elle est d'environ 675nm (rouge lointain) pour AlPcS_{2a} et 415nm pour TPPS_{2a} (Hogset et al., 2004).

La PCI a été utilisée avec succès pour assister l'internalisation efficace d'ON et donc améliorer leur activité en cellules, même si les exemples sont peu nombreux. Il a ainsi été montré qu'une inhibition de l'activité télomérase par un PNA ou un CPP-PNA ciblant hTERT pouvait être observée en cellules uniquement après PCI médiée par TPPS_{2a} (Folini et al., 2003) (Folini et al., 2007).

Dans une autre étude, l'impact de la PCI sur l'activité d'un PNA correcteur d'épissage couplé au CPP TAT a été évalué. La PCI médiée par AlPcS_{2a} permet d'obtenir 35% d'ARNm corrigés avec le conjugué TAT-PNA contre 10% en absence d'irradiation (Shiraishi and Nielsen, 2006). On peut également citer une étude de 2003 où la PCI s'est montrée efficace pour augmenter d'un facteur dix l'activité de siARN. Dans ce cas, le composé photosensible qui a été utilisé est le TPPS_{2a} et les siARN, dirigés contre l'ARNm d'EGFR, étaient complexés en lipoplexes (Oliveira et al., 2007).

L'intérêt de la PCI est de promouvoir la sortie des endosomes d'ON qui, même vectorisés, ne parviennent pas à s'en échapper pour atteindre leur cible et sont dégradés ou séquestrés dans ces vésicules. La PCI permet ainsi de réduire les concentrations actives d'ON. Une irradiation dans le rouge lointain est en outre compatible avec une application *in vivo* en

traitement local puisque les ondes de cette longueur peuvent pénétrer dans les tissus jusqu'à deux centimètres de profondeur (Hogset et al., 2004).

L'inconvénient majeur de la PCI réside cependant dans la toxicité élevée générée par les composés photosensibles suite à leur irradiation. Ces agents, qui s'insèrent non seulement dans la membrane plasmique mais également dans les membranes intracellulaires, génèrent en effet de manière inévitable des dommages à de nombreuses structures cellulaires. Enfin, dans certains cas, le contenu des endosomes peut également être dégradé par les réactions photochimiques (Hogset et al., 2004).

3. La Riboflavine ou vitamine B2

La Riboflavine possède des propriétés biologiques, présentées dans ce chapitre, qui permettent d'envisager son utilisation pour l'internalisation cellulaire de molécules d'intérêt telles que les ON.

3.1 Nature et rôles biologiques des flavines

Les flavines sont composées d'un noyau hétérocyclique aromatique isoalloxazine et d'une chaîne carbonée greffée sur l'azote en position 10 du cycle. Il existe trois types de flavines à l'état naturel, qui se distinguent par la nature de leur chaîne carbonée :

- la Riboflavine ou vitamine B2
- la Flavine Mononucléotide ou FMN
- la Flavine Adénine Dinucléotide ou FAD

La Riboflavine (Figure 3.1) est produite par de nombreuses plantes, champignons et bactéries. L'Homme ne la synthétise pas et l'absorbe par son alimentation (produits laitiers, viande, poissons gras, céréales, légumes verts...) ou par certaines bactéries intestinales qui la produisent. La dose journalière de Riboflavine recommandée est de 1.3 mg/jour pour l'homme et 1.1 mg/jour pour la femme (Burgess et al., 2009). Cette vitamine joue un rôle essentiel pour diverses fonctions cellulaires ainsi que pour le développement foetal et la croissance. Un défaut de Riboflavine peut d'ailleurs entraîner un retard de croissance, une anémie, des lésions de la peau ou encore une dégénération du système nerveux (Foraker et al., 2003).

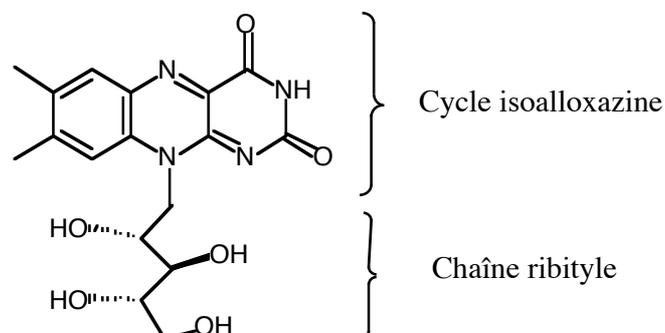


Figure 3.1 : Structure chimique de la Riboflavine

C'est la forme Riboflavine qui est absorbée par les cellules, et qui est par la suite phosphorylée pour donner la FMN, qui peut à son tour être transformée en FAD par la FAD synthétase (Foraker et al., 2003).

Le noyau isoalloxazine, qui peut accepter ou donner un ou deux électrons, confère des propriétés redox aux flavines qui interviennent au cours de multiples processus enzymatiques. La FMN et la FAD interagissent avec des protéines et jouent un rôle de coenzyme pour catalyser diverses réactions chimiques. Lorsque ces coenzymes interagissent fortement ou sont liées de manière covalente avec des protéines, on parle de flavoprotéines. Ces protéines ont diverses fonctions métaboliques et sont classées selon le type de réaction qu'elles catalysent : oxydases, monooxygénases, hydrolases, déshydrogénases, réductases ou encore transférases.

3.2 Mécanisme d'internalisation cellulaire de la Riboflavine

La Riboflavine est absorbée au niveau de l'épithélium intestinal pour être ensuite distribuée à divers organes. Le mécanisme par lequel la Riboflavine est absorbée dans les cellules est étudié depuis plusieurs décennies.

Il a été suggéré dans un premier temps qu'elle pouvait être internalisée par un mécanisme non spécifique faisant suite à son interaction avec des protéines sériques telles que l'albumine (Foraker et al., 2003). L'étude de l'internalisation de Riboflavine radiomarquée sur des lignées de différentes origines (placenta, sang, rein, foie, colon, rétine, sein...) a permis par la suite d'identifier un mécanisme spécifique d'internalisation (Huang and Swaan, 2001) (Zempleni and Mock, 2000) (Kumar et al., 1998) (Said et al., 1998) (Said et al., 2000) (Said et al., 2005) (Bareford et al., 2008). En dessous d'une concentration extracellulaire de 5 μ M en Riboflavine, un mécanisme d'internalisation actif, dépendant de l'énergie, est effectivement observé. Au delà de 5 μ M, un mécanisme d'entrée passif semble permettre l'entrée de la Riboflavine (Bareford et al., 2008). Des études en microscopie de fluorescence sur l'internalisation d'un conjugué entre la Riboflavine et la Rhodamine ont par ailleurs permis d'identifier que ce mécanisme actif passerait par les voies d'endocytose médiée par la clathrine et *caveolae*, dans des trophoblastes placentaires humains (Foraker et al., 2007).

Ces données concernant un mécanisme actif ne permettent cependant pas de conclure sur l'existence d'un récepteur membranaire et/ou d'une protéine circulante qui transporterait la Riboflavine jusqu'à la membrane cellulaire.

C'est chez le poulet qu'une protéine transportant la Riboflavine, ou RCP (Riboflavin Carrier Protein), a été identifiée pour la première fois. D'après une recherche de similarité de séquence, cette protéine ferait partie de la famille des protéines de liaison au folate (vitamine B9) qui peuvent s'ancrer à la membrane plasmique des cellules par un motif GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Monaco, 1997) (Foraker et al., 2003).

La protéine RCP aviaire, soluble et sécrétée, existe sous trois formes qui sont le fruit de modifications post-traductionnelles et qui sont retrouvées dans le blanc d'oeuf, le jaune d'oeuf et le plasma de la poule pondeuse. La forme plasmatique de la RCP, d'une taille de 37 kDa, est produite par le foie sous le contrôle des oestrogènes tandis que les formes présentes dans l'oeuf sont produites par l'oviducte de la poule (Monaco, 1997). Chez le poulet, la protéine RCP régule le transport de la Riboflavine au fœtus et est indispensable à son développement (Foraker et al., 2003). Aucun ancrage à la membrane de la protéine RCP n'a été démontré à ce jour et il est plutôt suggéré que le complexe RF-RCP serait internalisé après interaction de la RCP avec des partenaires membranaires qui restent à identifier (Mason et al., 2006). Il a d'ailleurs été observé que les trois formes de RCP liées à la Riboflavine pouvaient interagir avec la vitellogénine et que ce complexe était internalisé par le récepteur au LDL (Low Density Lipoprotein) (Monaco, 1997).

La protéine RCP est très conservée dans l'évolution et elle a pu être détectée par réactivité croisée d'anticorps anti-RCP de poulet dans le sérum de nombreuses espèces de vertébrés telles que le crapaud, la tortue, la souris, le rat, la vache, certains singes ou encore l'Homme. Chez l'Homme, une protéine RCP dont on ne connaît pas encore la séquence a été détectée dans le sérum de la femme enceinte, dans le liquide amniotique ou encore dans le lait (Mason et al., 2006). D'après des études d'internalisation sur des trophoblastes placentaires humains, la Riboflavine serait internalisée par endocytose médiée par un récepteur suite à son interaction avec la RCP humaine (Mason et al., 2006).

Il a en outre été établi que cette protéine transportant la Riboflavine est présente de manière plus abondante dans le sérum de patients atteints de carcinomes du sein (Rao et al., 1999) (Karande et al., 2001) et du foie (Rao et al., 2006) comparativement aux sujets sains. La RCP serait également surexprimée dans de nombreuses lignées de carcinomes de la prostate (Johnson et al., 2009).

Trois récepteurs membranaires à la Riboflavine ont été identifiés récemment chez l'Homme et nommés hRFT1, hRFT2 et hRFT3 (human Riboflavin Transporter). Ces trois protéines ont un pourcentage d'identité en acides aminés élevé entre elles et sont exprimées de

manière différentielle selon les tissus. Elles ont une spécificité similaire envers la Riboflavine tandis que leur affinité pour leur ligand semble varier quelque peu (Yao et al., 2010).

hRFT1 est une protéine de 448 acides aminés exprimée principalement dans le placenta, l'intestin grêle et le colon et il a été supposé qu'elle soit positionnée sur la membrane basolatérale des cellules endothéliales intestinales (Yonezawa et al., 2008) (Yao et al., 2010).

De son côté, hRFT2 possède 11 domaines transmembranaires putatifs et son extrémité C terminale, extracellulaire, serait indispensable à son positionnement à la membrane (Yamamoto et al., 2009) (Subramanian et al., 2011) (Figure 3.2). Elle est exprimée abondamment dans l'intestin grêle, la prostate et les testicules et serait responsable de l'absorption intestinale de la Riboflavine au niveau de la membrane apicale (Yao et al., 2010). Le gène codant pour hRFT2 a par ailleurs été associé à un locus de susceptibilité pour le carcinome du cardia gastrique et le carcinome épidermoïde de l'oesophage (Wang et al., 2010).

Le récepteur hRFT3, quant à lui, est détecté principalement dans le cerveau et les glandes salivaires (Yao et al., 2010).

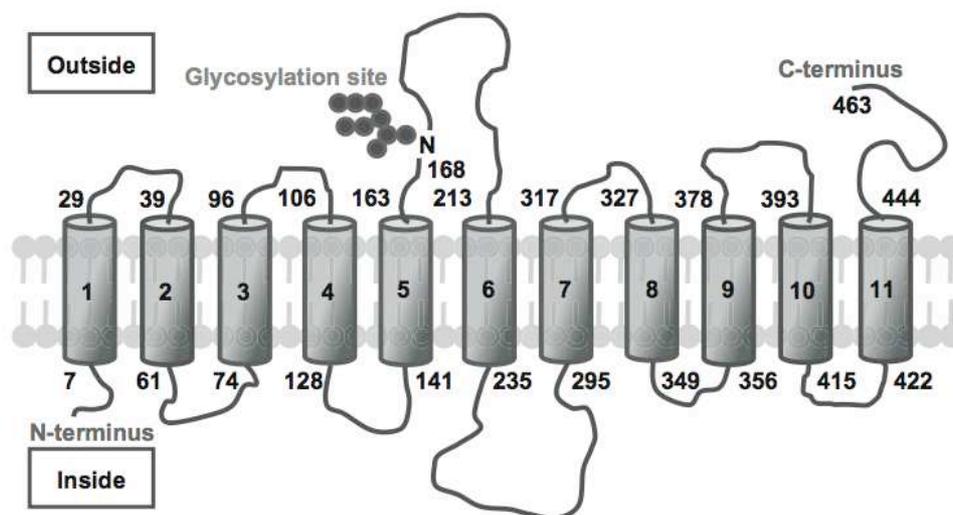


Figure 3.2 : Structure secondaire hypothétique de la protéine RFT2 de rat, orthologue à hRFT2 avec 87% d'identité de séquence (Yamamoto et al., 2009)

Que ce soit dans le cas de la protéine RCP ou des trois récepteurs hRFT, c'est le noyau isoalloxazine qui semble être essentiel pour l'interaction de la Riboflavine avec ces protéines (Monaco, 1997) (Yamamoto et al., 2009).

3.3 Vectorisation par la Riboflavine

La Riboflavine a été utilisée à deux reprises dans des approches de vectorisation. La première étude, assez succincte, démontre la capacité de la Riboflavine à internaliser la protéine BSA (Bovine Serum Albumin) (Holladay et al., 1999). Contrairement à la BSA seule, la BSA liée de manière covalente à la Riboflavine par sa chaîne ribityle est internalisée dans la lignée cellulaire humaine KB (cancer du col de l'utérus) en 2 heures à 37°C, à une concentration de l'ordre du micromolaire. Cette internalisation est active et suivie par une accumulation dans des structures endosomales. D'après des expériences de compétition, il semble cependant que la voie d'entrée empruntée par le conjugué Riboflavine-BSA soit différente de celle de la Riboflavine seule.

Dans une seconde étude, la Riboflavine a été multiples fois greffée sur un nanotransporteur de type polyamidoamine (PAMAM) dendrimère (Thomas et al., 2010). Le but de cette approche est d'utiliser la Riboflavine comme ligand spécifique de cellules cancéreuses pour délivrer une molécule cytotoxique, le méthotrexate. Cette stratégie repose sur les travaux décrivant la surexpression de la protéine RCP dans le contexte de cancers du sein, du foie et de la prostate.

Les résultats de cette étude montrent que le conjugué Riboflavine-PAMAM-fluorescéine est internalisé par la lignée cellulaire humaine KB. En outre, le conjugué Riboflavine-PAMAM-méthotrexate induit une toxicité sur les cellules traitées, contrairement aux cellules traitées par un conjugué Riboflavine-PAMAM. De manière identique à l'étude précédemment citée, des expériences de compétition montrent que la voie empruntée par le conjugué diffère de celle empruntée par la Riboflavine seule. Les auteurs de ces travaux concluent que le conjugué Riboflavine-PAMAM est internalisé par un récepteur à la Riboflavine et que la vitamine B2 constitue un bon ligand pour cibler les cellules cancéreuses.

On peut néanmoins déplorer l'absence, dans cette étude, du point contrôle "PAMAM non conjugué à la Riboflavine" qui permettrait de caractériser le rôle de la Riboflavine dans l'internalisation du conjugué, en particulier pour le ciblage. Il serait en outre souhaitable d'étudier et de comparer l'efficacité d'internalisation du conjugué Riboflavine-PAMAM dans diverses lignées cellulaires cancéreuses ou non, et de rechercher une corrélation avec le niveau d'expression de la protéine RCP ou des différents récepteurs à la Riboflavine. Ces données permettraient de conclure réellement sur le potentiel de la Riboflavine pour cibler des lignées cancéreuses.

4. Présentation du projet

4.1 Objectif

La Riboflavine est une petite molécule organique qui est internalisée dans la cellule par divers récepteurs membranaires exprimés abondamment dans certains tissus. En outre, la Riboflavine peut être internalisée suite à son interaction avec une protéine transporteur, la RCP, qui serait surexprimée dans certaines tumeurs.

L'objectif de ce projet est d'étudier le potentiel de la Riboflavine, ou vitamine B2, en tant que ligand permettant l'internalisation possiblement ciblée de molécules antisens.

4.2 Etapes du projet

Le projet repose sur des conjugués entre des dérivés de la Riboflavine, la Flavine et Lumichrome, et différents oligonucléotides antisens PNA ou LNA, dont la synthèse a été effectuée par le Dr Philippe Simon dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Marc Fontecave.

Le premier objectif de ce projet est de déterminer l'impact éventuel de la Flavine ou du Lumichrome sur la fixation et l'activité antisens des oligonucléotides et d'isoler les oligonucléotides les plus efficaces sur l'ARNm choisi comme cible. Pour répondre à ces questions, nous avons étudié les propriétés de fixation *in vitro* sur leur cible, ainsi que l'efficacité d'inhibition de la traduction des différents oligonucléotides et conjugués, sur une lignée cellulaire HeLa rapporteur.

L'activité biologique en pénétration libre des conjugués Flavine et Lumichrome sélectionnés a ensuite été explorée sur le même système rapporteur en cellules.

En parallèle, des expériences de microscopie de fluorescence et de cytométrie en flux ont permis de caractériser les propriétés d'internalisation cellulaire de conjugués fluorescents Flavine/Lumichrome - oligonucléotide - Rhodamine sur différentes lignées cellulaires, dans le but d'optimiser l'activité biologique en pénétration libre. Ces dernières études nous ont permis de mettre en évidence une propriété inattendue et intéressante de ces double-conjugués, qui a été explorée dans le cadre de ce travail de thèse.

Résultats

1. Sélection, propriétés et activité cellulaire des conjugués Flavine et Lumichrome

1.1 Chimie des oligonucléotides antisens et des conjugués

La séquence cible contre laquelle sont dirigés les oligonucléotides antisens utilisés dans cette partie du projet est la séquence Polypurine Tract (PPT) du virus de l'Immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), présente au sein de la séquence codante de l'intégrase et du gène nef et parfaitement conservée dans toutes les souches de VIH-1. Cette séquence (5' AAAAGAAAAGGGGGGA 3') a été caractérisée au laboratoire et ciblée dans le cadre d'approches oligonucléotides. Pour cette étude, elle a été intégrée dans une lignée cellulaire modèle dont les caractéristiques et les avantages, dans le cadre de ce travail, seront décrits plus tard (paragraphe 1.3).

Différents ON ciblant la séquence PPT ont été choisis : deux PNA 13mer et un 18mer décliné en diverses chimies, PNA, LNA-ADN mixmer, LNA-ADN gapmer ou Phosphorothioate (Table 1.1). Les deux PNA courts, 13C et 13T, ciblent respectivement la partie 3' et 5' de la séquence PPT. L'ON 18LD, composé de 5 nucléotides LNA à chaque extrémité et 8 nucléotides ADN au centre, a été conçu selon les règles connues pour une activation optimale de la RNase H par les LNA-ADN gapmer (Kurreck et al., 2002) (Grunweller et al., 2003). Le 18mer PS est ici utilisé comme contrôle positif (Faria et al., 2001), tandis que des PNA et LNA ne ciblant pas la séquence PPT sont utilisés comme contrôles négatifs (ctrl, Table 1.1).

Tous les ON ciblant PPT, mis à part certains ON contrôles, ont été couplés chimiquement à un dérivé de la Riboflavine, nommé Flavine (F), ou à un dérivé non redox de la Riboflavine, le Lumichrome (L). La nomenclature utilisée pour désigner les conjugués est la suivante : F-ON pour un conjugué Flavine, et L-ON pour un conjugué Lumichrome. Le couplage de la Flavine ou

du Lumichrome a été réalisé sur l'extrémité N terminale des PNA (Figure 1.1) ou l'extrémité 5' des LNA (Figure 1.2).

Chimie de l'ON	Nom	Séquence (5' -> 3' ou N -> C)	Longueur
PNA	13C	TCCCCCTTTTCT k	13mer
	13T	CCCCTTTTCTTT k	13mer
	PNA ctrl	TTTTCTCTCCCT k	13mer
	18P	TCCCCCTTTTCTTTTAA k	18mer
LNA-ADN mixmer	18L	TcCcCcCtTtTcTtTtaa	18mer
	LNA ctrl	aAaTtTaGgGaTaAcAgg	18mer
LNA-ADN gapmer	18LD	tccccCTTTTCTttaa	18mer
	LD ctrl	aaattTAGGGATAacagg	18mer
Phosphorothioate	18PS	TCCCCCTTTTCTTTTAA	18mer

Table 1.1 : Séquences et chimies des différents ON ciblant la séquence PPT 5' TTAAGAAAAGGGGGAT 3', et de leurs contrôles

Dans le cas des LNA-ADN : en majuscule : nucléotide ADN, en minuscule : nucléotide LNA
Tous les PNA et conjugués PNA possèdent une lysine (k) à l'extrémité C terminale

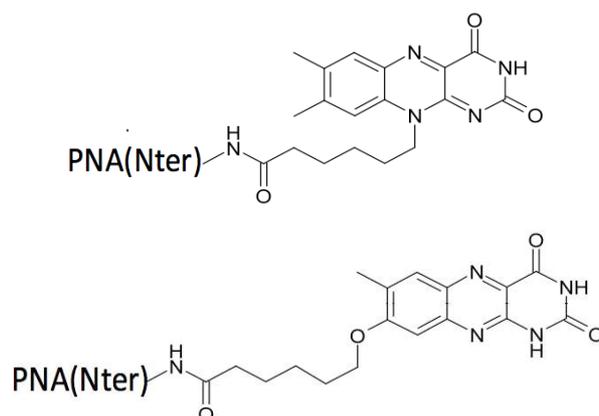


Figure 1.1 : Structures chimiques d'un conjugué Flavine-PNA (en haut) et Lumichrome-PNA (en bas)

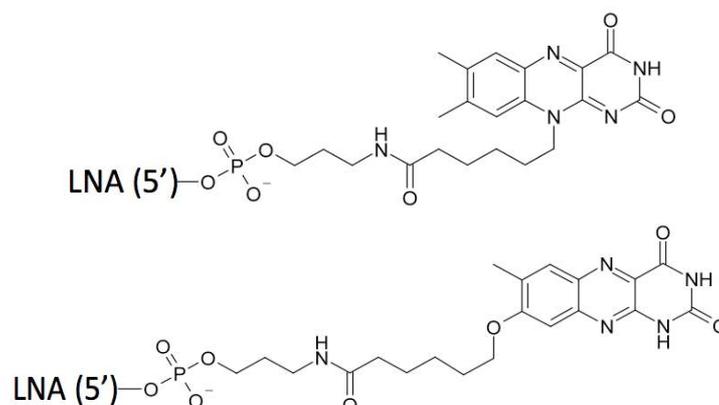


Figure 1.2 : Structures chimiques d'un conjugué Flavine-LNA (en haut) et Lumichrome-LNA (en bas)

1.2 Fixation à l'ARN des oligonucléotides et conjugués *in vitro*

L'objectif de ces expériences est de caractériser l'affinité des différentes molécules étudiées pour leur cible, et de savoir si la Flavine et le Lumichrome altèrent ou non cette fixation. La fixation des ON et des conjugués est évaluée sur une cible ARN PPT 19mer complémentaire radiomarquée, par la technique de gel retard.

Les expériences de gel retard avec les ON 18PS, 18LD et 18L démontrent une fixation en duplexe sur l'ARN cible pour ces trois molécules. A la concentration la plus basse en ON, à savoir 3nM, 100% de la cible simple brin est retardée par la fixation de l'un de ces trois ON. Ce résultat est similaire pour les conjugués F-18LD, L-18LD, F-18L et L-18L. Les ON LNA ctrl et LD ctrl, quant à eux, ne s'hybrident pas sur l'ARN PPT, même à des concentrations aussi élevées que 200nM. Les profils observés pour 18LD et LNA ctrl sont montrés à titre d'exemple sur la Figure 1.3.

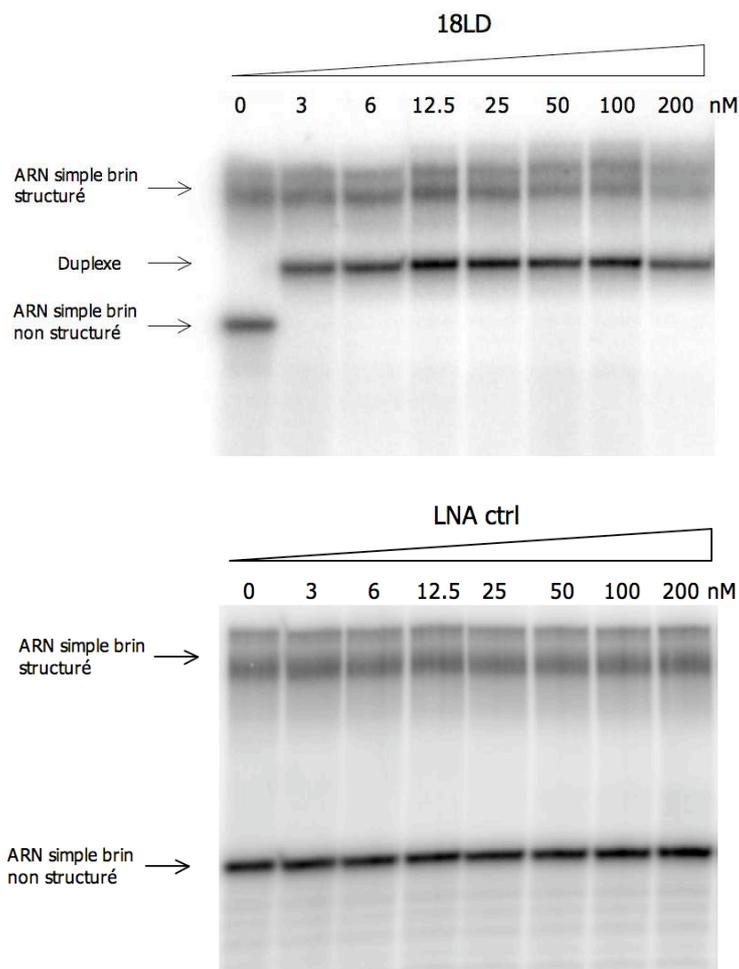


Figure 1.3 : Expériences de retard sur gel de 3nM d'ARN PPT radiomarqué en fonction de la concentration en 18LD (en haut) ou LNA ctrl (en bas), de 0 à 200 nM

Les expériences de retard sur gel avec les PNA 13C, 13T et 18P démontrent une fixation de ces trois ON sur leur cible ARN avec la formation tout d'abord d'un duplexe, puis à des concentrations plus élevées en PNA, d'un complexe à la migration plus retardée, vraisemblablement de type PNA₂/ARN. Il est à noter que ce complexe PNA₂/ARN apparaît à une concentration de 12.5nM de 13T, tandis qu'il est formé plus tardivement dans le cas de 13C et 18P, à partir de 50nM d'ON.

Ces trois PNA peuvent potentiellement former deux structures à trois brins: un triplex total avec le 3^{ème} brin Hoogsteen en orientation anti-parallèle, ou un triplex partiel en orientation parallèle. A titre d'exemple, les structures possiblement formées dans le cas du PNA 13T sont présentées sur la Figure 1.4. Divers paramètres tels que l'orientation anti-parallèle, le caractère partiel du triplex parallèle ainsi que la présence d'un bloc de cytosines, nécessitant une protonation, sont des éléments défavorables à la formation de ces triplexes. Il n'est pas possible de conclure sur la nature des complexes PNA₂/ARN formés à la seule vue des expériences de retard sur gel réalisées ici.



Figure 1.4 : Structures potentiellement formées par le PNA 13T sur sa cible

En noir : ARN cible PPT, en rouge : 13T formant un duplexe, en bleu : 13T formant un triplex anti-parallèle total, en vert et gris : 13T formant un triplex parallèle partiel

Dans le cas des trois PNA étudiés, la conjugaison chimique à la Flavine et au Lumichrome semble déstabiliser légèrement la fixation des PNA sur leur cible. Ces observations sont illustrées par les données obtenues pour le PNA 13T et les conjugués F-13T et L-13T, présentées sur les Figures 1.5 et 1.6.

On peut y remarquer que l'ARN simple brin non structuré est totalement retardé à des concentrations en PNA plus élevées dans le cas des conjugués (environ 25 nM et 100nM pour F-13T et L-13T, respectivement) que dans le cas du PNA seul (environ 12,5nM pour 13T).

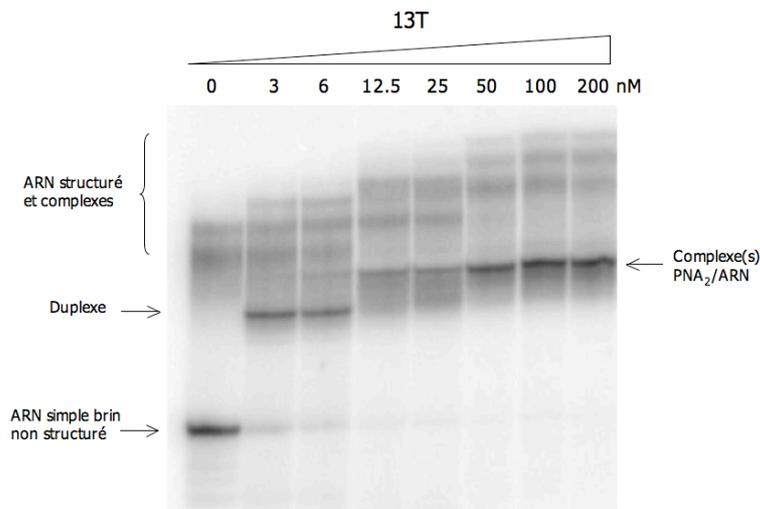


Figure 1.5 : Expérience de retard sur gel de 3nM d'ARN PPT radiomarqué en fonction de la concentration en PNA 13T, de 0 à 200 nM

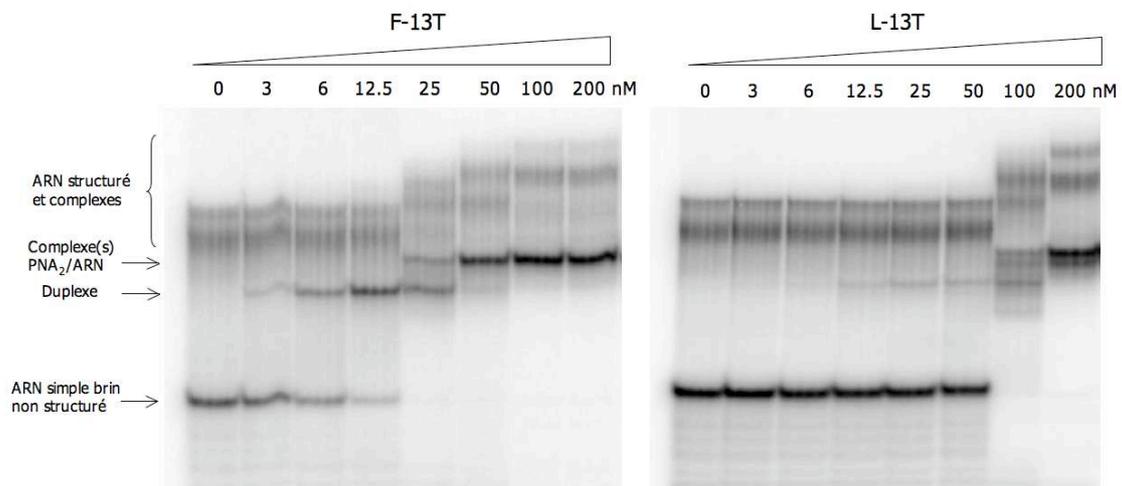


Figure 1.6 : Expérience de retard sur gel de 3nM d'ARN PPT radiomarqué en fonction de la concentration en conjugués F-13T (à gauche) ou L-13T (à droite), de 0 à 200 nM

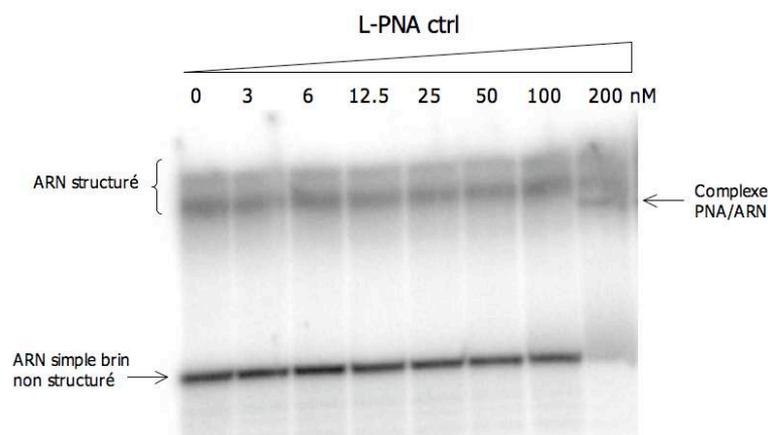


Figure 1.7 : Expérience de retard sur gel de 3nM d'ARN PPT radiomarqué en fonction de la concentration en conjugué L-PNA ctrl, de 0 à 200 nM

Le PNA ctrl, ainsi que les conjugués F-PNA ctrl et L-PNA ctrl, provoquent un retard partiel de migration de l'ARN cible non structuré à des concentrations élevées en PNA (à partir de 100nM environ). Ces PNA et conjugués semblent donc interagir avec l'ARN PPT à fortes concentrations, probablement par formation d'un duplexe partiel au niveau des nucléotides Nter TTTTC Cter situés à l'extrémité N terminale du PNA ctrl. Le résultat obtenu en retard sur gel pour le conjugué L-PNA ctrl, présenté sur la Figure 1.7, montre effectivement un retard de migration pour une fraction de l'ARN PPT à 200nM en conjugué.

Ces expériences de retard sur gel ont permis d'attester de la fixation efficace *in vitro* de tous les ON choisis sur la cible ARN PPT, ainsi que d'une faible (PNA ctrl) voire une absence (LNA ctrl et LD ctrl) de fixation des séquences contrôles dans la gamme de concentrations étudiées. Le couplage de la Flavine et du Lumichrome n'affecte pas la fixation des ON contenant des LNA, et ne déstabilise que modérément la fixation des PNA.

Il est à noter que la séquence PPT, dans sa version ARN, forme des structures liées à la présence de six guanines consécutives, probablement de type G-quartet (Boutimah-Hamoudi et al., 2007), mais que les ON sont néanmoins capables de s'y fixer.

1.3 Activité cellulaire des oligonucléotides et conjugués après perméabilisation

L'activité antisens des ON et conjugués dans un contexte cellulaire a été évaluée sur une lignée cellulaire HeLa rapporteur disponible au laboratoire. Cette lignée HeLa, baptisée 1002, contient de manière stablement intégrée une construction composée du gène codant pour la Luciférase *Photinus pyralis* (Luc) sous la direction d'un promoteur CMV inductible à la Doxycycline. La séquence cible PPT est présente entre le promoteur et le codon AUG du gène Luc, soit dans la région transcrite mais non traduite du gène (5'UTR de l'ARNm). La fixation d'ON antisens sur la séquence PPT peut provoquer, selon la nature chimique de l'ON, un blocage stérique de la traduction ou une dégradation de l'ARNm Luc par activation de la RNase H. Cette activité antisens doit se traduire, dans les deux cas, par une diminution de la production de la protéine Luciférase dans la cellule, et donc par une diminution de l'activité Luciférase qui est facilement quantifiable (Figure 1.8).

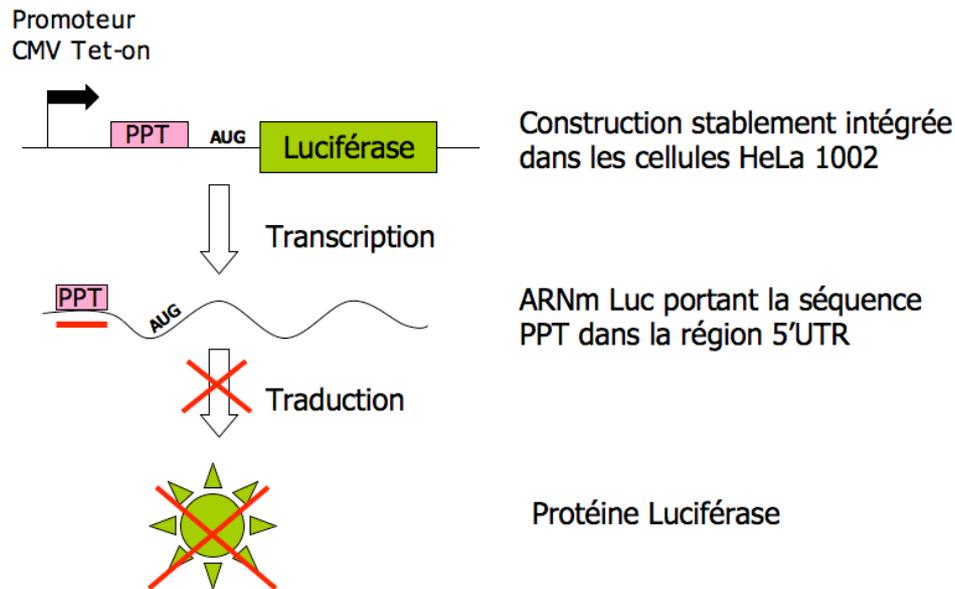


Figure 1.8 : Système cellulaire rapporteur de la lignée HeLa 1002
Rectangle rouge : ON antisens

Les ON et conjugués sont ici délivrés dans les cellules suite à une perméabilisation par la Streptolysine O. Pour ce faire, les cellules HeLa 1002 sont perméabilisées en présence de la concentration en ON indiquée sur les Figures (260 000 cellules dans un volume de 20µl). Une fois la perméabilisation terminée, les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits (cellules et ON dilués 66 fois) et sont induites à la Doxycycline. L'activité Luciférase est ensuite quantifiée 24 heures après l'induction des cellules.

Les moyennes d'activité Luciférase (RLU/µg de protéines) obtenues pour chaque ON et conjugué, exprimées en pourcentage de l'activité Luciférase normalisée à 100% pour les points non traités (cellules perméabilisées en absence d'ON, NT), sont présentées sur les Figures 1.9 et 1.10.

Les résultats révèlent tout d'abord des disparités d'efficacité entre les différents ON. L'ON 18PS démontre bien une activité antisens avec environ 60% d'inhibition de l'activité Luciférase, témoignant de l'accessibilité de la cible ARN dans les cellules. L'ON 18LD provoque également 60% d'inhibition de l'activité Luciférase, mais à une concentration quatre fois plus faible que le 18PS, tandis que le LD ctrl ne provoque aucune inhibition (Figure 1.9). L'ON 18LD a été utilisé à une concentration de 2.5µM du fait d'une toxicité cellulaire observée à des concentrations plus élevées telles que 5 ou 10µM.

L'ON 18L est en revanche quasi-inactif avec seulement 15% d'inhibition environ, soit du même ordre que l'inhibition non spécifique observée pour le LNA ctrl (Figure 1.9). Ceci semble

indiquer la nécessité d'une activation de la RNase H pour une inhibition efficace de l'activité Luciférase avec cette séquence LNA.

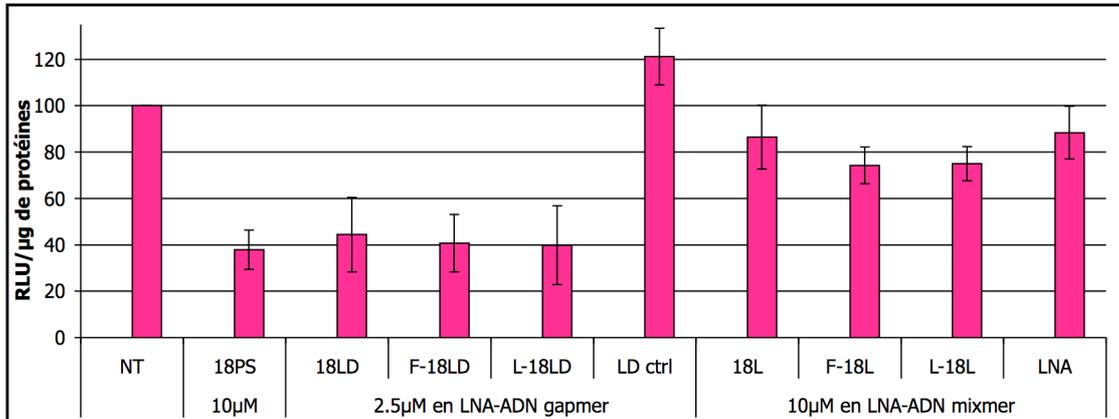


Figure 1.9 : Moyennes de l'activité Luciférase de cellules HeLa 1002 perméabilisées en présence de 2.5µM ou 10µM d'ON ou conjugué

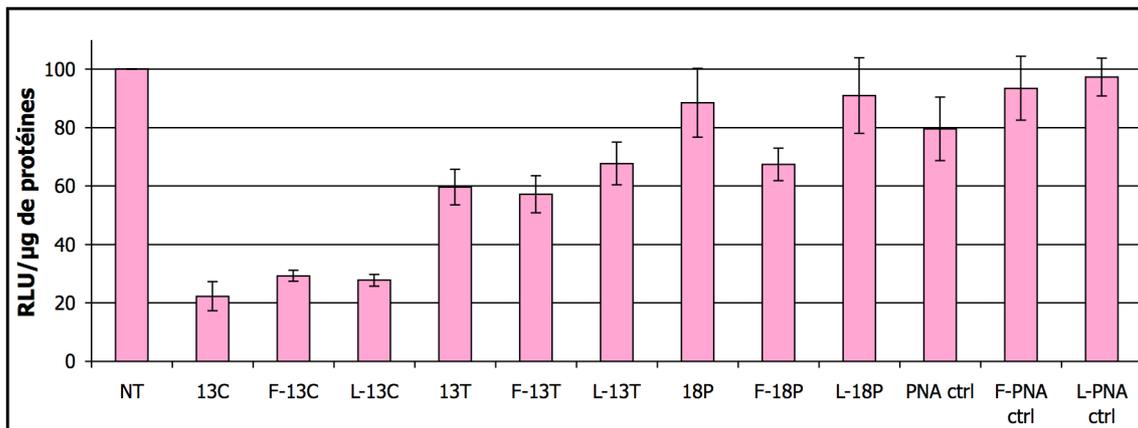


Figure 1.10 : Moyennes de l'activité Luciférase RLU/µg de protéines de cellules HeLa 1002 perméabilisées en présence de 10µM de PNA ou conjugué PNA

Concernant les PNA les plus courts, à savoir 13C et 13T, une inhibition d'environ 40% et 80% respectivement est observée par rapport au point non traité (Figure 1.10). Au contraire, le PNA 18mer 18P ne provoque qu'une inhibition de seulement 10% à peu près de l'activité Luciférase, soit du même ordre que l'inhibition non spécifique provoquée par le PNA ctrl, d'environ 20%.

Les ON antisens testés les plus efficaces sont donc le LNA-ADN gapmer 18LD et le PNA 13C. L'activité de 13C a été étudiée à des concentrations plus faibles (Figure 1.11) et le résultat montre une dose réponse avec une inhibition de l'activité Luciférase d'environ 55% à 2.5 μ M, et de 78% à 10 μ M. A concentration équivalente, ces deux ON ont donc une efficacité similaire malgré des modes d'action présumés différents : blocage stérique pour 13C et induction d'un clivage catalytique par la RNase H pour 18LD.

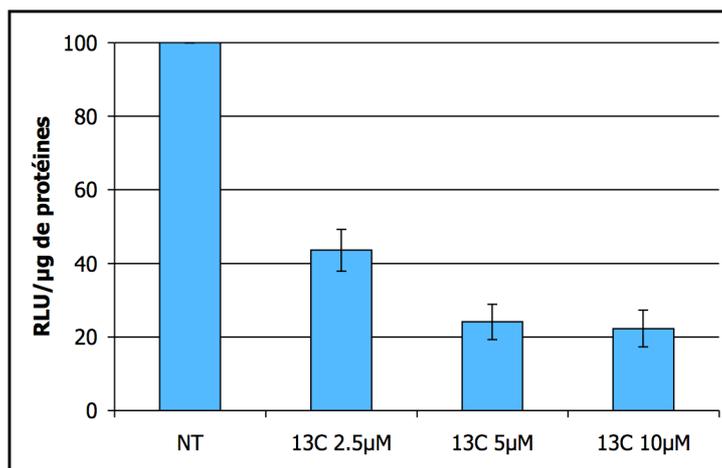


Figure 1.11 : Moyennes de l'activité Luciférase de cellules HeLa 1002 perméabilisées en présence de 2.5, 5 ou 10 μ M de 13C

Enfin, le couplage à la Flavine et au Lumichrome ne semble pas diminuer significativement l'activité de 18LD et 13C. En effet, une variation de seulement 5% maximum est observée entre l'activité Luciférase de 18LD ou 13C et leurs conjugués Flavine et Lumichrome respectifs (Figure 1.9 et 1.10). Ce sont donc les conjugués F-18LD, L-18LD, F-13C et L-13C qui sont retenus pour la suite du projet.

1.4 Mécanisme d'action des conjugués sélectionnés

Nous avons souhaité poursuivre la caractérisation des molécules sélectionnées en investiguant le mécanisme d'action sous-jacent à l'inhibition de l'activité Luciférase observée avec 18LD et 13C, et leurs conjugués respectifs. Deux mécanismes d'action distincts sont supposés avec d'une part, la dégradation par la RNase H de l'ARNm Luc au niveau du duplexe formé avec 18LD (ou 18PS, contrôle positif) et d'autre part, le blocage stérique de l'initiation de

la traduction par l'hybridation de ^{13}C sur la région 5'UTR de l'ARNm Luc. Nous avons, pour ce faire, analysé l'ARN cible après traitement par les différents ON, *in vitro* et en cellules.

1.4.1 Test de coupure par la RNase H *in vitro*

Dans ce but, il a tout d'abord été vérifié que l'hybridation de l'ON 18LD et de ses conjugués sur l'ARN 19mer PPT induisait une dégradation de ce dernier par la RNase H *in vitro*. Cette expérience consiste à incuber l'ARN PPT radiomarké avec différents ON ou conjugués puis à y ajouter la RNase H, dans des conditions de température et de tampon adéquates pour son activité. Les produits de la réaction sont ensuite déposés sur gel pour une migration en conditions dénaturantes. Une éventuelle activité de la RNase H sur l'ARN radiomarké est alors révélée sur le gel par la présence de produits correspondant à l'ARN clivé. Le résultat de ce test de dégradation par la RNase H est présenté sur la Figure 1.12.

Les premières observations qui peuvent être faites à la vue de ce résultat concernent les contrôles négatifs. On peut tout d'abord remarquer qu'aucune dégradation par la RNase H n'est visible pour les pistes sans ON ou en présence de LD ctrl, où aucun duplexe n'est formé avec l'ARN cible. Par ailleurs, aucun clivage par la RNase H n'est observé en présence de 18L, LNA-ADN mixmer utilisé ici comme contrôle négatif. Il est à noter que le duplexe ARN/18L est si stable qu'il n'est pas dissocié dans les conditions dénaturantes de l'expérience et induit un retard de migration de la cible.

Comme attendu, les ON 18PS et 18LD induisent tous deux une dégradation de l'ARN par la RNase H. Le profil de dégradation diffère cependant pour les deux molécules puisque sept produits principaux sont détectés pour 18PS, contre seulement deux produits de dégradation pour 18LD. Cette différence s'explique par la fenêtre ADN de 18LD qui restreint les possibilités de coupure par la RNase H au niveau du duplexe ARN/18LD. Les différentes coupures induites par la RNase H en présence de 18PS ou 18LD sont représentées sur la Figure 1.13 qui révèle, dans le cas de 18PS, des sites de clivage de 6 à 12nt de l'extrémité 5' de l'ARN au sein du duplexe ARN/18PS et dans le cas de 18LD, deux sites uniques de clivage à 10 et 11nt de l'extrémité 5' de l'ARN au sein du duplexe ARN/18LD. Ces données sont proches des observations faites avec un ON PS 17mer par Crooke d'une part (Crooke et al., 1995), et avec un LNA-ADN gapmer 18mer par Kurreck d'autre part (Kurreck et al., 2002)

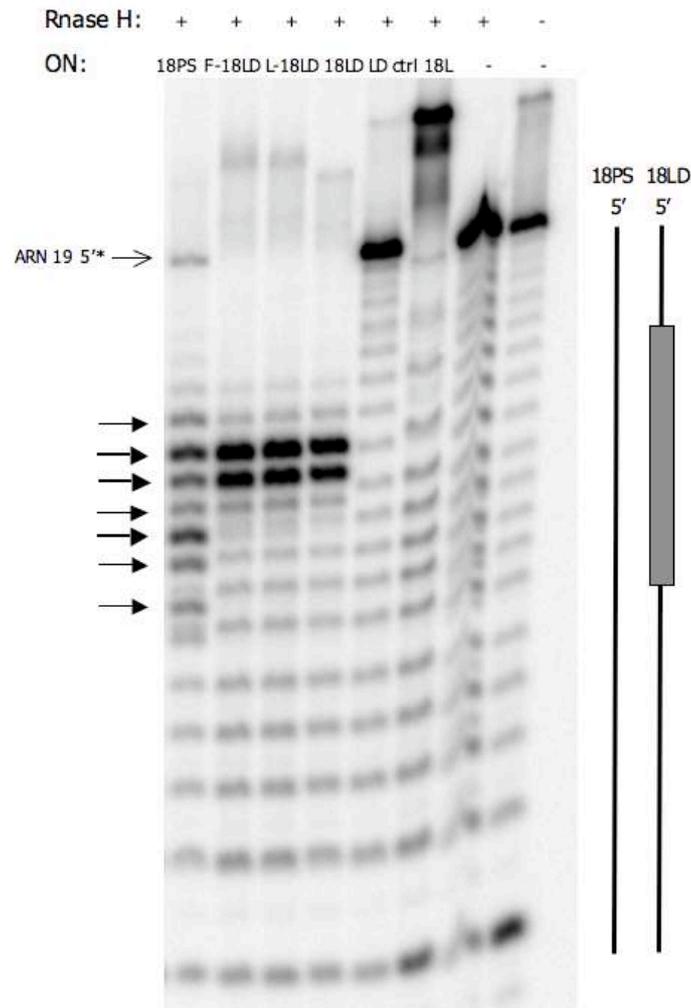


Figure 1.12 : Test de dégradation par la RNase H de l'ARN PPT radiomarqué en 5'
 La concentration en ON et conjugués est de 400nM. La piste sans RNase H et sans ON correspond à l'ARN cible chauffé à 100°C pendant 1 heure et sert de marqueur de séquence.
 Le positionnement des ON sur la cible est représenté à droite du gel.
 Rectangle gris : emplacement de la fenêtre ADN sur 18LD.

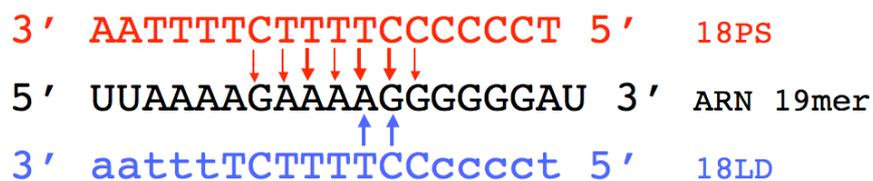


Figure 1.13 : Les différents produits de dégradation générés par la RNase H
 En noir : ARN PPT radiomarqué en 5', en rouge : 18PS et les flèches correspondant aux différentes coupures, en bleu : 18LD et les flèches correspondant aux différentes coupures, en majuscule : nucléotide ADN, en minuscule : nucléotide LNA

Il est important de remarquer que les profils de coupure obtenus avec les conjugués F-18LD et L-18LD sont similaires à celui de l'ON 18LD, ceci indiquant que le couplage à la Flavine ou au Lumichrome n'affecte ni la fixation, ni l'activité de clivage de l'enzyme.

Il est enfin à noter que dans le cas de 18LD, une incubation d'une heure avec la RNase H aurait suffi pour obtenir une dégradation de l'ARN PPT. Cependant, le temps d'incubation de cette expérience a dû être prolongé toute une nuit de manière à pouvoir observer des produits de dégradation pour le point 18PS. Cette différence de cinétique de clivage peut s'expliquer par une inhibition de la RNase H en présence d'une concentration élevée de 18PS par rapport à la concentration en cible ARN, en excès d'un facteur 40 dans nos conditions expérimentales. Ce phénomène, bien décrit, serait le fait de la fixation non spécifique d'ON PS sur l'enzyme et peut être évité si la concentration en 18PS n'excède pas de plus d'un facteur deux la concentration en cible ARN (Gao et al., 1992) (Crooke et al., 1995).

1.4.2 Quantification des ARNm Luciférase

La caractérisation du mécanisme d'action des conjugués sélectionnés a été poursuivie par la quantification des ARNm Luc de cellules HeLa 1002 perméabilisées en présence de différents ON et conjugués. Le but de cette quantification est de discriminer entre les deux mécanismes d'actions possibles pour les ON antisens. En effet, une activation de la RNase H doit conduire à une dégradation et donc à une diminution de la quantité d'ARNm Luc, contrairement aux ON agissant par blocage stérique de la traduction.

En pratique, l'ARN des cellules traitées est récupéré 24h après leur induction à la Doxycycline et rétro-transcrit en ADNc (ADN complémentaire), en parallèle du dosage de l'activité Luciférase présenté précédemment. La quantité relative d'ARNm Luc peut alors être déterminée par PCR quantitative, et il est ainsi possible de connaître le contenu cellulaire en ARNm Luc, correspondant à l'activité Luciférase mesurée dans le paragraphe 1.3.

Il est important de noter que les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc Luc excluent la séquence PPT dans le but d'éviter tout effet inhibiteur de l'amplification de la part d'ON, et notamment de PNA, qui pourraient être présents et hybridés sur la cible lors de la réaction de PCR. Une courbe standard obtenue avec les amorces Luc est présentée en Figure 1.14 pour illustrer l'efficacité optimale qui peut être obtenue avec le couple d'amorces utilisé.

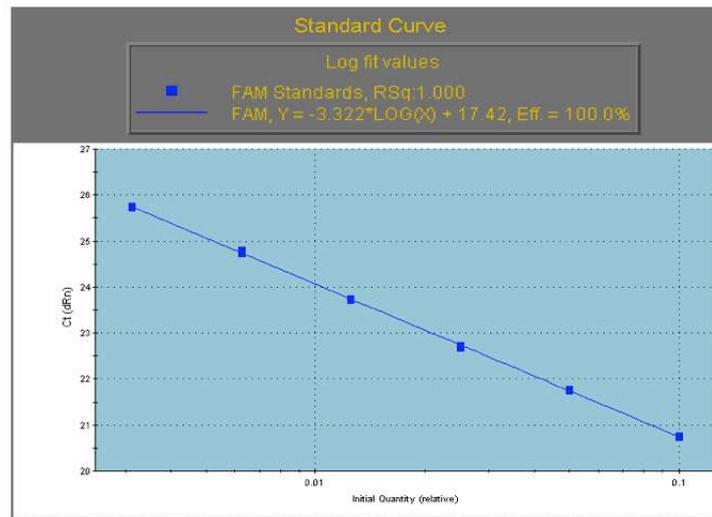


Figure 1.14 : Courbe standard obtenue avec les amorces Luc (Efficacité : 100%, R² : 1.0)
 Courbe obtenue à partir de dilutions sérielles (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320)
 d'ADNc de cellules HeLa 1002 non traitées

Les résultats du dosage des ARNm Luc par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) sont présentés sur la Figure 1.15 sous forme de ratio entre l'abondance des ARNm du gène Luc et d'un gène contrôle (GUSB).

La première observation qui peut être faite sur ces résultats de RT-qPCR concerne les PNA. Comme attendu pour des ON bloqueurs stériques, aucune diminution de la quantité d'ARNm Luc n'est détectée dans les cellules traitées par 10µM de 13C, F-13C ou L-13C, ni pour le PNA ctrl. Au contraire, et de manière très surprenante, une forte exaltation du ratio ARNm Luc/GUSB, d'un facteur 2 à 3, est observée pour ces quatre points par rapport au point non traité.

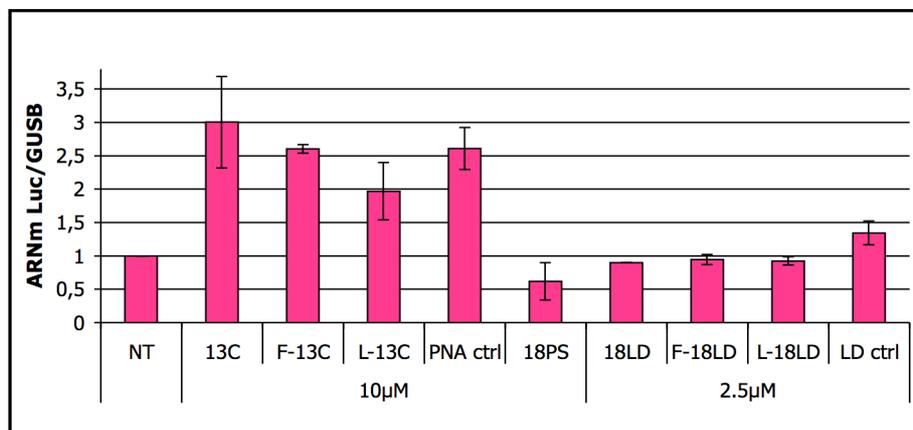


Figure 1.15 : Quantification relative des ARNm Luciférase par RT-qPCR sur cellules HeLa 1002 traitées par 2.5µM ou 10µM d'ON ou conjugué
 NT : point non traité dont le ratio ARNm Luc/GUSB est fixé à 1

Il a tout d'abord été vérifié que cette augmentation d'un facteur 2 à 3 de la quantité d'ARNm Luc est également détectée en utilisant un autre gène de référence tel que GAPDH au lieu de GUSB (résultats non montrés). Par ailleurs, afin de déterminer si cette exaltation est le fruit d'un effet du PNA au cours de la réaction d'amplification, une PCR quantitative a été conduite sur l'ADNc de cellules non traitées suite à l'ajout de 0,1 μ M final de PNA 13C directement dans le milieu réactionnel. Aucune variation des ratios Luc/GUSB ni Luc/GAPDH n'a été observée dans ces conditions par rapport aux points contrôles sans ajout de 13C, et l'hypothèse d'un effet PNA pendant la PCR peut donc être écartée (résultats non montrés).

Ce phénomène d'exaltation reflèterait donc bien une augmentation de la quantité d'ARNm Luc dans les cellules traitées par un de ces PNA. Le mécanisme sous-jacent à cette observation n'a pas été élucidé même si quelques hypothèses seront formulées dans la discussion (paragraphe 1.6).

La seconde série de données de la Figure 1.15 concerne les ON et conjugués 18LD ainsi que les ON 18PS et LD ctrl, qui correspondent aux contrôles positif et négatif, respectivement. Une diminution de la quantité d'ARNm Luc de l'ordre de 40% est obtenue suite au traitement des cellules par 10 μ M 18PS. Dans le cas des cellules traitées par 2.5 μ M de 18LD, F-18LD ou L-18LD, une faible inhibition de seulement 5 à 10% par rapport au point non traité est observée. Enfin, les cellules traitées par 2.5 μ M de LD ctrl montrent une exaltation d'environ 40% de la quantité d'ARNm Luc.

Dans la mesure où l'ON 18L, de séquence et de stabilité équivalentes à 18LD mais n'activant pas la RNase H, n'inhibe que très faiblement l'expression de la Luciférase (Figure 1.9, environ 15% d'inhibition), il semble peu probable que l'activité d'inhibition de la traduction de 18LD (Figure 1.9, environ 60% d'inhibition) ne passe pas, du moins en partie, par une dégradation de l'ARNm Luc par la RNase H.

Nous proposons, selon ce raisonnement, de fixer les données du point LD ctrl comme référence de niveau d'ARNm pour l'analyse des données 18LD. En effet, il est possible d'interpréter l'exaltation de 40% du point LD ctrl comme un phénomène lié à la nature chimique de l'ON, et qui se produirait de manière similaire avec un ON de séquence différente, tel que 18LD. Dans la mesure où 18LD est effectivement de même nature chimique et construit sur le même modèle que LD ctrl, on peut supposer qu'une exaltation similaire à celle observée pour LD ctrl génère une surestimation des données de quantification d'ARNm Luc pour 18LD, F-18LD et L-18LD. Après normalisation, et dans le cas où cette hypothèse serait vérifiée, l'inhibition du taux d'ARNm Luc serait d'environ 30% pour 18LD et ses conjugués Flavine et Lumichrome (Figure 1.16). Il semble donc, dans ce cas de figure, que l'inhibition de 60% de l'activité

Luciférase obtenue avec ces trois molécules (Figure 1.9) soit expliquée en partie par la dégradation de l'ARNm Luc par la RNase H, et en partie par un mécanisme ne provoquant pas la dégradation de l'ARNm.

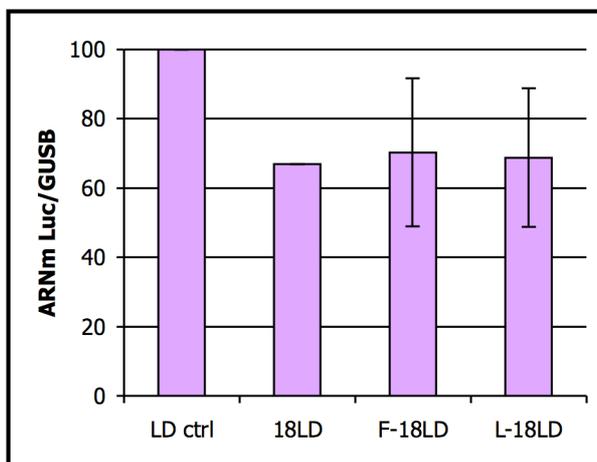


Figure 1.16 : Quantification relative des ARNm Luciférase par RT-qPCR sur cellules HeLa 1002 perméabilisées en présence de 2.5 μ M d'ON ou conjugués
Résultats exprimés en pourcentage du ratio Luc/GUSB obtenu pour le point LD ctrl

1.5 Activité des conjugués sélectionnés en pénétration libre

L'étape suivante du projet a consisté à tester l'activité des conjugués sélectionnés (F-13C, L-13C, F-18LD et L-18LD) en pénétration libre dans le système expérimental cellulaire HeLa 1002. Le déroulement de l'expérience est le suivant : les cellules HeLa adhérentes sont traitées par une solution de conjugués à une concentration donnée, les cellules sont induites par la Doxycycline à la suite du traitement, puis sont lysées pour la lecture de l'activité Luciférase.

Si les conjugués Flavine ou Lumichrome pénètrent seuls dans le cytoplasme des cellules HeLa, une inhibition de l'activité Luciférase devrait être observée à la suite d'une telle expérience. Il est cependant évident que la quantité de conjugués possiblement internalisés peut difficilement atteindre une concentration aussi élevée que lors de la perméabilisation à la SLO. C'est pour cette raison que seuls les conjugués très efficaces pour inhiber l'activité Luciférase (Figures 1.9 et 1.10 : environ 80% et 60% d'inhibition pour les conjugués 13C à 10 μ M et 18LD à 2.5 μ M, respectivement) ont été retenus pour mener ce test en pénétration libre.

Différents paramètres expérimentaux ont fait l'objet d'une tentative d'optimisation dans le but de détecter une activité cellulaire des conjugués en pénétration libre, tels que :

- le milieu de culture des cellules au moment de l'ensemencement : DMEM classique ou dépourvu en Riboflavine
- la densité cellulaire à l'ensemencement : de 4000 à 16000 cellules par puits de plaque 96 puits
- la concentration en conjugués : à partir de 10nM et jusqu'à 10 μ M
- le milieu de traitement : OptiMEM ou DMEM dépourvu en Riboflavine et supplémenté ou non en sérum
- le temps de traitement : de 3 à 4 heures
- le délai entre la fin du traitement et l'induction des cellules à la Doxycycline : de 0 à 20 heures
- le délai entre l'induction et la lyse des cellules : de 24 à 40 heures

Un exemple de résultat de test d'activité en pénétration libre est présenté sur la Figure 1.17 où l'activité Luciférase mesurée est exprimée en pourcentage de l'activité Luciférase du point non traité (induit à la Doxycycline en absence d'ON, NT). Les activités Luciférase présentées ici résultent de la moyenne de points en triplicate au sein d'une même expérience.

Les conditions expérimentales du résultat présenté sont les suivantes : 4000 cellules par puits sont ensemencées en milieu DMEM classique, le traitement par les ON ou conjugués dure 4 heures en milieu OptiMEM et est immédiatement suivi par l'induction à la Doxycycline. Enfin, le délai entre l'induction et la lyse des cellules est de 40 heures.

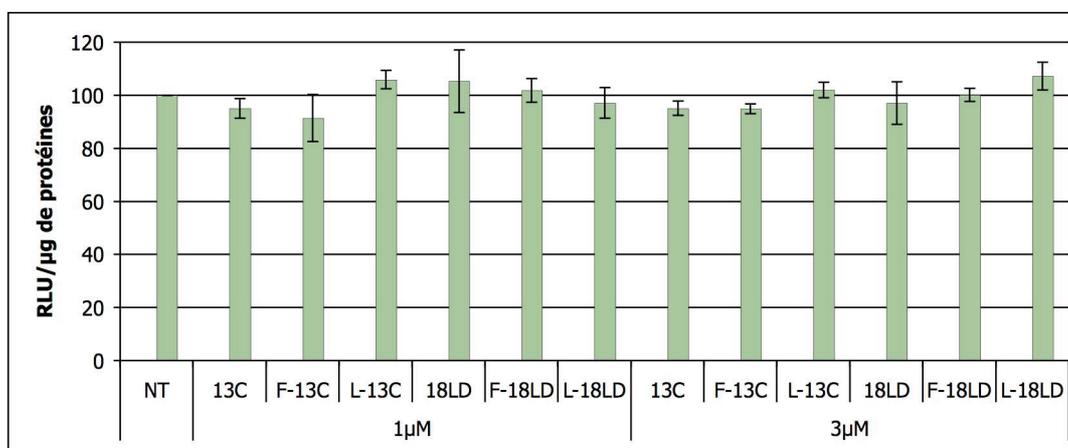


Figure 1.17 : Test d'activité en pénétration libre sur cellules HeLa 1002 traitées par 1 μ M ou 3 μ M d'ON ou de conjugués 13C ou 18LD

La Figure 1.17 illustre l'absence d'activité détectée pour les conjugués Flavine et Lumichrome testés. L'activité Luciférase des conjugués oscille autour de 100% sans différence significative avec les ON non couplés. Malgré la variation des paramètres expérimentaux cités précédemment, aucune inhibition de l'activité Luciférase n'a pu être observée avec les conjugués F-13C, L-13C, F-18LD ou L-18LD dans notre système expérimental.

1.6 Discussion

Plusieurs remarques s'imposent à l'issue des expériences réalisées dans la première partie de ce projet, et dont les résultats peuvent être mis en regard des données de la littérature.

Stabilité du complexe ARN/ON et activité cellulaire

Il est tout d'abord intéressant de comparer les données de stabilité des complexes ARN/ON issues des expériences de retard sur gel, avec les efficacités d'inhibition de l'activité Luciférase en cellules perméabilisées. La Figure 1.18 représente sous une forme différente les résultats obtenus en gels retard pour les PNA 13C, 13T et 18P, avec le pourcentage de cible ARN non retardée (sur laquelle l'ON n'est pas hybridé) reporté en fonction de la concentration en ON.

D'après ces données, la concentration en PNA à partir de laquelle il y a moins de 10% de cible non retardée est de : 3nM pour 13C, 6nM pour 13T et 50nM pour 18P. A titre de rappel, les efficacités d'inhibition de l'activité Luciférase en cellules après perméabilisation pour ces molécules sont d'environ 80, 40 et 10% d'inhibition pour 13C, 13T et 18P respectivement (Figure 1.10). Une corrélation apparaît donc entre ces deux séries de résultats puisque les PNA étudiés sont d'autant plus actifs pour inhiber la traduction que leur fixation sur la cible ARN *in vitro* est efficace.

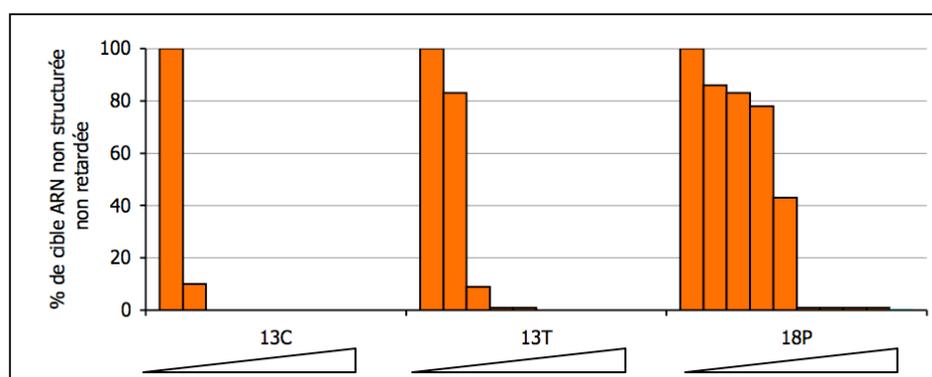


Figure 1.18 : Pourcentage d'ARN cible non retardé en fonction de la concentration en PNA 13C, 13T ou 18P
Concentrations en PNA : 0 ; 3 ; 6 ; 12.5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 nM

Cette corrélation suggère donc que les propriétés de fixation de ces différents PNA sur l'ARNm cible pourraient contribuer à expliquer les différences d'activité de ceux-ci en cellules. Le fait que le PNA 18mer 18P soit inefficace, *in vitro* et en cellules, peut être expliqué par un défaut de solubilité, d'autant plus important qu'un PNA est long, ainsi qu'un plus grand risque de s'auto-structurer et de développer des interactions non spécifiques en cellules (Nulf and Corey, 2004).

Dans le cas des LNA, aucune corrélation n'est observée entre les données d'hybridation *in vitro* et d'activité cellulaire. En effet, tandis que les fixations en gel retard de 18L et 18LD sont similaires et plus efficaces que certains PNA actifs en cellules, l'activité cellulaire de 18LD approche 60% d'inhibition de l'activité Luciférase à 2.5 μ M quand celle de 18L ne dépasse pas 15% à 10 μ M. Cette différence très marquée d'activité entre 18L et 18LD, ainsi que l'absence d'activité de 18LD, sont assez inattendues et inexplicables puisque les quelques travaux comparant l'activité de deux LNA-ADN isoséquentiels déclinés en gapmer ou mixmer et ciblant la région 5'UTR d'un ARNm décrivent une activité similaire pour les deux ON (Wahlestedt et al., 2000) (Braasch et al., 2002). En revanche, le fait que l'activité antisens de 18LD soit supérieure à celle du contrôle positif 18PS est cette fois-ci en accord avec la littérature (Grunweller et al., 2003).

Mécanisme d'action des ON et conjugués

L'analyse des ARN cibles, *in vitro* et en cellules, a permis de comparer directement le mécanisme d'action d'ON LNA-ADN gapmer ou PS, de même séquence. Il est intéressant de remarquer, à la vue des données d'activité en cellules perméabilisées, de RT-qPCR ainsi que de RNase H *in vitro*, qu'une partie de l'activité antisens de 18LD pourrait être due à un effet stérique de celui-ci et qui s'ajouterait à l'activation de la RNase H, ce qui n'est pas observé dans le cas de 18PS.

L'inhibition de l'activité Luciférase observée suite à la perméabilisation des cellules HeLa 1002 en présence d'ON est supposée être due à une interaction de l'ON avec sa cible complémentaire présente sur l'ARNm Luc. Il convient cependant de discuter la possibilité pour les ON ciblant la séquence PPT de s'hybrider sur l'ADN par formation d'une triple hélice et d'agir ainsi au niveau transcriptionnel, un tel mécanisme d'action devant se traduire par une diminution des ARNm Luc après traitement par les ON.

Même si l'ON 18LD induit une certaine diminution des ARNm Luc en RT-qPCR, sa fixation sur l'ADN peut être exclue pour les raisons suivantes : sa séquence est non compatible avec la

formation d'un triplex à motif TC en orientation parallèle, ou seulement partiellement pour 9 triplets. En outre, la chimie de 18LD, qui porte plusieurs LNA consécutifs à ses extrémités, ne permet pas la flexibilité nécessaire à la formation d'une triple hélice stable.

En ce qui concerne les PNA, aucune diminution des ARNm Luc n'a été observée en RT-qPCR dans les cellules traitées par 13C (Figure 1.15), ceci permettant d'exclure un effet transcriptionnel. Cet élément est compatible avec le fait que, même si des structures en triplex sur l'ADN peuvent théoriquement être formées par invasion de brin, celles-ci sont assez défavorables pour les motifs évoqués précédemment dans le contexte d'une fixation sur l'ARN (orientation anti-parallèle ou caractère partiel du triplex parallèle et présence d'un bloc de cytosines).

Le mécanisme responsable de l'augmentation importante de la quantité d'ARNm Luc dans les cellules traitées par les PNA 13C ou PNA ctrl (Figure 1.15) ne peut être identifié avec les seules expériences qui ont été réalisées. Une étude de Baker datant de 1997 offre cependant des pistes intéressantes (Baker et al., 1997). Les auteurs de ces travaux ont en effet observé une exaltation d'un facteur 2 à 2.5 de l'ARNm d'ICAM-1 suite à la transfection par lipides cationiques d'un ON 20mer 2'-O-(2-méthoxy)éthyl. De manière similaire à notre étude, les ON utilisés sont des bloqueurs stériques dirigés contre la région 5'UTR de l'ARNm ciblé, les cellules étudiées sont humaines et une induction transitoire est nécessaire pour déclencher la transcription du gène ICAM-1, par TNF- α en l'occurrence. Une différence importante est cependant l'absence d'une telle exaltation lorsque les cellules sont transfectées par l'ON contrôle, contrairement à ce qui est observé avec le PNA ctrl dans notre étude.

Les auteurs ont pu établir que cette augmentation des ARNm ICAM-1 se produisait dans la fraction cytoplasmique et qu'elle n'était due ni à une augmentation de la transcription, ni à une altération du transport des ARNm ciblés du noyau vers le cytoplasme. Ils suggèrent donc que l'inhibition de la traduction provoquée par la fixation de l'ON sur la région 5'UTR ralentirait la dégradation, couplée à la traduction, de l'ARNm. Il est également possible d'imaginer que la stabilisation de l'ARNm induite par la fixation de l'ON empêche la dégradation de celui-ci.

De telles hypothèses seraient assez convaincantes pour expliquer nos observations mais ne cadrent pas avec le cas du PNA ctrl. Il est toutefois possible d'imaginer que des interactions entre le PNA ctrl et l'ARNm Luc au niveau de la séquence PPT, détectées à fortes concentrations en gel retard (Figure 1.7), soient suffisantes pour stabiliser l'ARNm et le protéger de la dégradation, tout en étant trop peu stables pour inhiber l'initiation de la traduction de manière aussi efficace que le PNA 13C. Selon ce raisonnement, une telle exaltation se traduirait donc par

une augmentation de la demi-vie des ARNm Luc hybridés à un PNA, par rapport aux cellules non traitées.

Une dernière remarque qui peut être faite sur les données de cette première partie du projet concerne le potentiel redox de la Flavine. Il a déjà été montré qu'un conjugué Flavine-PNA pouvait induire des dommages spécifiques de séquence sur un ADN simple-brin *in vitro* suite à la réduction de la Flavine par la Flavine réductase, générant la production de radicaux et d'espèces oxydantes (Simon et al., 2006). Nous avons en outre observé que la Flavine pouvait générer des cassures double-brin de l'ADN en cellules (données non publiées). Il était donc possible d'imaginer que les conjugués F-13C et F-18LD hybridés sur leur cible puissent dégrader l'ARNm Luc en cellules par ce mécanisme, contrairement aux ON couplés au Lumichrome qui n'a pas de propriétés redox. La quantification des ARNm Luc en RT-qPCR n'a cependant révélé aucune dégradation de ce type puisque les ratios Luc/GUSB des conjugués F-13C et F-18LD ne sont aucunement inférieurs aux ratios Luc/GUSB des conjugués Lumichrome respectifs. Il semble donc que les conjugués Flavine étudiés n'induisent pas de dommages sur la séquence PPT de l'ARNm Luc dans notre système expérimental.

1.7 Conclusions

L'étude de la formation des complexes ARN/ON (retard sur gel) et de l'inhibition de la traduction d'un gène rapporteur après perméabilisation cellulaire, ont permis de sélectionner un PNA 13mer et un LNA-ADN gapmer 18mer comme les ON antisens ciblant la séquence PPT les plus efficaces. Les conjugués Flavine et Lumichrome de ces deux ON possèdent une activité en cellules similaire aux molécules non couplées et ont été retenus pour la suite du projet.

La caractérisation du mécanisme d'action des molécules sélectionnées a été réalisée par l'analyse des ARN cibles en cellules et *in vitro*. Les séquences 18LD inhibent la traduction *via* la dégradation de l'ARN cible, mais ce mécanisme n'explique pas à lui seul l'inhibition de l'activité Luciférase générée par ces molécules en cellules, probablement associé en plus à un blocage stérique. D'autre part, un mécanisme d'action de type blocage stérique de la traduction est observé pour les séquences 13C et est associé à une forte exaltation de l'abondance des ARNm Luc qui reste à expliquer.

Des expériences d'activité cellulaire en pénétration libre n'ont cependant pas permis de déceler une activité pour aucun des quatre conjugués testés, malgré la variation de divers paramètres expérimentaux.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce manque d'activité telles que : une absence d'internalisation des conjugués, une séquestration des conjugués dans les endosomes après endocytose ou encore une concentration intracellulaire trop faible pour déceler une activité. L'étude de conjugués Flavine et Lumichrome fluorescents dans le chapitre suivant permettra de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

2. Mécanismes d'internalisation cellulaire des conjugués Flavine et Lumichrome

2.1 Séquences des conjugués fluorescents

Un LNA-ADN mixmer ainsi que six PNA ont été couplés à la Flavine ou au Lumichrome d'une part, et au fluorochrome tétraméthyl-Rhodamine (R), d'autre part. Le but d'un tel couplage est de pouvoir étudier l'internalisation de conjugués Flavine et Lumichrome dans les cellules par microscopie de fluorescence ou cytométrie en flux, ce que ne permettent pas les propriétés de fluorescence de la Flavine et du Lumichrome, d'après nos observations.

La nomenclature utilisée pour désigner les conjugués est la suivante : F-ON-R pour un conjugué fluorescent Flavine, et L-ON-R pour un conjugué fluorescent Lumichrome. Le couplage de la Rhodamine a été réalisé sur l'extrémité C terminale des PNA *via* une lysine, ou sur l'extrémité 3' du LNA.

Les PNA 13C et 13T ainsi que le LNA-ADN 18L, étudiés dans le chapitre précédent et ciblant la séquence PPT, font partis des séquences choisies, ainsi que les PNA P12, P1, P2 et P3 (Table 2.1).

Chimie de l'ON	Nom	Séquence (5' -> 3' ou N -> C)	Longueur
PNA	13C	TCCCCCTTTTCT	13mer
	13T	CCCCTTTTCTTT	13mer
	P12	TCTGACGATTAG	12mer
	P1	GTCTTCCATGGTG	13mer
	P2	GGCTTTACCAAC	12mer
	P3	GGAATGCCAAGC	12mer
LNA-ADN mixmer	18L	ACAGTTCTCGTTCTGAGA	18mer

Table 2.1 : Séquences et chimies des différents ON conjugués à la Rhodamine

Dans le cas des LNA-ADN : en majuscule : nucléotide ADN, en minuscule : nucléotide LNA

Les conjugués F-P12-R et L-P12-R ont été les premiers conjugués fluorescents synthétisés, dans le but de réaliser une étude préliminaire à l'initiation de ce projet sur la vectorisation d'ON par des dérivés de la Riboflavine. L'internalisation, visualisée au microscope à fluorescence, des conjugués F-P12-R et L-P12-R dans les cellules HeLa 1002 a permis dans un premier temps d'apporter la preuve du potentiel des dérivés de la Riboflavine pour la

vectorisation d'ON. Dans un deuxième temps, le mécanisme d'internalisation cellulaire de ces deux conjugués a été étudié en détails par des approches de microscopie et de cytométrie, et fait l'objet de l'article qui suit.

2.2 Etude de l'internalisation cellulaire de conjugués F-PNA-R et L-PNA-R : article

2.2.1 Résumé

La synthèse puis l'étude des propriétés d'internalisation cellulaire de deux conjugués composés d'un PNA 12mer couplé à la Flavine ou au Lumichrome, ainsi qu'à la Rhodamine, ont permis d'établir que de tels conjugués étaient internalisés efficacement par diverses lignées cellulaires. Cette internalisation intervient dès une heure d'incubation mais se révèle plus importante après trois heures de traitement à 37°C. Le profil de fluorescence observé correspond à un marquage principalement vésiculaire qui persiste 24 heures après le traitement des cellules. Le signal détecté dans le cas du conjugué contrôle, composé du PNA couplé à la Rhodamine, correspond à un bruit de fond témoignant d'une absence d'internalisation.

La forte diminution de l'internalisation des conjugués suite à une incubation à 4°C ou en présence d'azoture de sodium nous permet de conclure à un mécanisme d'entrée dépendant de l'énergie, tel que l'endocytose. En outre, des expériences de colocalisation avec divers marqueurs de voies endocytaires ou acidotropique ont permis d'établir que les conjugués Flavine et Lumichrome sont internalisés, du moins en partie, par une voie similaire à celle empruntée par le Dextran dans les cellules HeLa et que les vésicules observées en microscopie à des temps longs échouent partiellement dans les lysosomes.

Par ailleurs, des expériences d'internalisation en présence d'un excès de Riboflavine ou de Lumichrome non conjugués n'ont pas permis de détecter une compétition entre les conjugués et le ligand libre, ceci indiquant que le mécanisme d'entrée de ces deux types de molécules diffère.

Le traitement des cellules HeLa par divers agents lysosomotropiques n'a pas permis d'observer une libération significative du contenu des endosomes dans le cytosol. En revanche, une relocalisation du signal fluorescent des endosomes vers le cytosol et le noyau a été observée suite à l'irradiation prolongée des cellules à la longueur d'excitation de la Rhodamine (filtre rouge du microscope). La caractérisation des propriétés spectrales de la Flavine, du

Lumichrome et de la Rhodamine ainsi que des expériences sur des petites vésicules unilamellaires nous ont conduit à attribuer ce phénomène à de la PCI (internalisation photochimique) induite par la Rhodamine, qui agirait comme un agent photosensible capable de déstabiliser les lipides membranaires.

Ce travail, présenté dans l'article qui suit, a donc permis de démontrer pour la première fois la vectorisation d'un PNA par la Flavine et le Lumichrome dans diverses lignées cellulaires, ainsi qu'une sortie efficace des endosomes de ces conjugués suite à une activité de type PCI de la Rhodamine.

2.2.2 Article

Double functionalization of PNAs for nuclear-cytosolic delivery

Fanny MARLIN^{1,2,3}, Philippe SIMON^{1,2,3}, Aurélie FOSSEY^{1,2,3}, Patrizia ALBERTI^{1,2,3},
Loïc PERROUAULT^{1,2,3}, Marc FONTECAVE^{4,5}, Stéphanie BONNEAU^{6,7,8},
Carine GIOVANNANGELI*^{1,2,3}

¹ Museum National d'Histoire Naturelle, 43 rue Cuvier, F-75005 Paris, France

² CNRS, UMR7196, 43 rue Cuvier, F-75005 Paris, France

³ Inserm, U565, 43 rue Cuvier, F-75005 Paris, France

⁴ CEA, 17 avenue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

⁵ CNRS UMR5249, 17 avenue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

⁶ Collège de France, 11 place Marcelin-Berthelot, F-75005 Paris, France

⁷ Université Pierre et Marie Curie Paris 6, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

⁸ CNRS FRE 3207, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

Keywords: oligonucleotide delivery, peptide nucleic acid (PNA), oligonucleotide conjugate, riboflavin, photochemical internalization (PCI), rhodamine

Abstract

Oligonucleotides and their analogues, such as peptide nucleic acids, PNAs, are a validated chemical strategy for artificial control of gene expression. However, improvement of cellular uptake and cellular localization still remain one of the main obstacle for biological applications, especially for PNAs, and novel strategies need to be developed. In the present study we demonstrate that flavin or lumichrome conjugation allow PNAs to be efficiently internalized in cells via an endocytic pathway. In addition, a second conjugation with the rhodamine promotes PNA release from endosomes to cytosol and nucleus following photoactivation of the rhodamine present in flavin-PNA-rhodamine and lumichrome-PNA-rhodamine conjugates. In conclusion, a double functionalization using both an alloxazine moiety as a carrier and a mild photosensitizer attached to the cargo biomolecule, here a PNA, is a valuable design for photochemical internalization (PCI)-mediated cytoplasmic-nuclear delivery.

Peptide Nucleic Acids (PNAs) are DNA mimics with an uncharged peptide-like backbone. They display unique properties explaining why they have attracted intense interest in biotechnology and biomedicine. Indeed they are able to hybridize to RNA and DNA sequences selectively with very high affinity and are very resistant to nuclease degradation, with significant stability with regard to proteases. Consequently, PNAs have been developed both as an antisense and antigene agents, for artificial gene expression regulation and gene editing. Notably, antisense PNAs act as steric blockers since they are unable to activate RNase H and have been demonstrated to be highly effective in applications aimed at modulating splicing (for a review, see Bauman et al, 2009). On the other hand, despite being charge neutral, PNAs do not enter cells more readily than do negatively charged oligonucleotides and poorly diffuse through lipid membranes to the interior of intact cells. Methods of PNA delivery have been developed. One of the most commonly used in order to increase cellular uptake is based on PNA conjugation with small lipophilic molecules, and considerable work was done with cell penetrating positively charged peptides (CPP) (for a review, see Lebleu et al, 2008). However, the main fraction of PNA-CPP conjugates internalized by cells is retained in the endosome/lysosome compartments and additional treatment are needed for endosomal escape and nuclear/cytosolic liberation.

Here we report that chemical modification of PNAs with flavins and analogues, facilitate cellular uptake. Flavins are biological molecules present in cells as riboflavin, also known as vitamin B2, flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN), all containing a redox-active isoalloxazine group and a ribitol sugar moiety enjoying various chemical modifications. Riboflavin is an essential nutriment that is actively absorbed in eukaryotic cells by specialized transport mechanisms that still remain largely elusive, except the involvement of a Riboflavin Carrier Protein (RCP) in receptor-mediated riboflavin internalization. Two previous studies reported the use of flavins as carriers, one using a riboflavin-BSA conjugate (BSA= bovine serum albumin; Holladay et al, 1999) and one using a dendrimeric nanoparticle covalently linked to riboflavin (Thomas et al, 2010). The synthesis of PNA-flavin conjugates was previously described and it was shown that the presence of the flavin moiety maintained PNA affinity for complementary sequences (Simon et al, 2006). Because of the ability of reduced flavin to convert molecular oxygen into reactive oxygen species which are responsible for cellular damages including nucleic acid ones, we have now also designed and synthesized PNA-lumichrome conjugates, with lumichrome being a flavin analogue with an alloxazine ring lacking redox properties. We have thus been able to study cell penetration of PNA-lumichrome as well as PNA-flavin conjugates (L-PNA-R and F-PNA-R),

whose structures are shown in Figure 1. In addition, we report that conjugation of a second label, with photochemical properties such as rhodamine, in flavin-PNA-rhodamine and lumichrome-PNA-rhodamine, promote release of PNA conjugates from intracellular vesicular compartments to cytosol and nucleus, through a photochemical internalization (PCI) phenomenon.

We have carried out solid-phase synthesis of PNA (12-mer) conjugates, tagged with a synthetic flavin **1** (F) or a lumichrome **8** (L) at the N-terminus and a fluorescent label, a tetramethylrhodamine dye, TAMRA (R), attached at the C-terminus to the side-chain of a lysine residue. The C-terminal lysines were introduced to facilitate attachment of fluorophores. Rhodamine is an interesting dye in the context of this work since light absorption maxima of rhodamine, flavin and lumichrome are well separated (Supporting Figure S1A). Both **1** and **8** contain a tail with a carboxylate end for covalent attachment to the PNA through an amide bond. Synthesis of compound **8** is also shown in Figure 1. The utilization of a phenol precursor, compound **3**, allowed introducing the carboxylate tail at position 8 of the alloxazine ring so as to limit the structural modification brought to the lumichrome derivative. The fluorescence properties of rhodamine are not affected by the presence of either flavin or lumichrome (see Supporting Figure S1B).

The ability of flavin and lumichrome to deliver PNAs into cells was investigated by fluorescence microscopy on lived cells following treatment by fluorescent conjugates, F-PNA-R and L-PNA-R, and flow cytometry (FACS) was used for quantification. HeLa cells were treated with PNA conjugates and after 1, 2 or 3h of incubation at 37°C, intense rhodamine fluorescence was observed in intracellular, mainly vesicular, structures in the case of both F-PNA-R and L-PNA-R conjugates (Figure 2A). Based on fluorescence imaging and FACS quantification, the amount of internalized conjugates was found to increase with time up to 3h. (Figure 2). When cells were treated for 3h and further cultured in fresh medium for 21h (24h time point), cellular rhodamine fluorescence was still mainly localized in vesicular structures, of apparently smaller size. By contrast, cellular uptake experiments with PNA-rhodamine conjugate (PNA-R) showed only background level signal (Figure 2A), even after 3h incubation, indicating that the flavin or the lumichrome moiety was absolutely required for cellular internalization of PNAs.

Uptake studies were also carried out on various cell lines, namely Caco2, RPE1 and COS-1 cells. Riboflavin internalization has previously been shown on Caco2 (Foraker et al,

2003) and RPE1 (Said et al, 2005) cells and COS-1 cells are described for their lack of expression of Riboflavin Carrier Protein (Mason et al, 2006). After 3h of incubation with F-PNA-R or L-PNA-R, a fluorescent intracellular pattern similar to that obtained with HeLa cells was observed for the three cell lines (Supporting Figure S2), while no significant uptake of PNA-R could be detected. These results demonstrate that flavin and lumichrome can both mediate cellular uptake of PNAs in various human cell lines, as well as in a monkey cell line lacking the RCP, suggesting that this protein is not essential for PNA conjugate internalization.

Furthermore, we undertook a characterization of the uptake mechanism and intracellular localization of PNA conjugates. We first investigated uptake energy dependence, to discriminate between a direct process involving translocation of the lipid bilayer or energy-dependant vesicular mechanisms, referred to as endocytosis. We observed that the uptake by HeLa cells is almost abolished upon incubation at 4°C or depletion in cellular ATP by sodium azide treatment (Supporting Figure S3a). This indicates that the internalization of PNA conjugates is mediated in major part by an endocytic process. We then better defined the endocytosis pathway at work in HeLa cells and the subcellular trafficking of the conjugates. We examined the colocalization of the conjugates with labeled transferrin and dextran, well-known markers, respectively for clathrin-coated vesicle or smooth-vesicle endocytosis. At early time points (2h) there was extensive co-localization with dextran but no colocalization with transferrin (Supporting Figure S3b). In addition, an acidotropic marker known to localize in lysosomes, LysoTracker Green, was used and a partial overlap of red and green signals was observed, but only at longer incubation times of conjugates (26h). Taken together, these localization studies suggest that F-PNA-R and L-PNA-R conjugates are internalized in HeLa cells, in large part by the same endocytic pathway than Dextran, namely smooth-vesicle endocytosis, also called macropinocytosis, and finally PNA conjugates traffick up to lysosomes.

Obviously, those PNA-flavin and PNA-lumichrome conjugates are almost exclusively localized in endosomal compartments following uptake and thus by themselves do not provide mechanisms mediating efficient endosomal release. Sequestration of internalized PNAs in endocytic vesicles was shown to be detrimental for biological activity, preventing PNA access to their nucleic acid targets. We evaluated the effects on intracellular distribution of conjugates of endosomolytic agents that alter endosomal pH, namely chloroquine, primaquine and monensin. Chloroquine has been extensively and successfully used in several studies involving PNAs (Turner et al, 2005) while primaquine and monensin have been

shown to alter endosomal trafficking of internalized riboflavin (Bareford et al, 2008). Treatment of L-PNA-R pre-incubated HeLa cells with chloroquine or primaquine did not lead to visible changes of the fluorescent pattern (Supporting Figure S4), indicating that these compounds were unable to significantly disrupt the PNA-containing endosomal compartments and therefore to release PNA conjugates in the cytosol. Treatment instead by monensin, a Na⁺ ionophore that induces pH increase and neutralization of acidic compartments, led to an increase of the size of the vesicles and to only a weak fluorescent signal in the cytosol of some cells (Supporting Figure S4). These observations thus show that the three endosomolytic reagents tested here are inefficient for inducing significant endosomal release of the PNA-flavin and PNA-lumichrome conjugates.

An unexpected observation with regard to the endosomal escape of PNA conjugates was made during fluorescence microscope analysis. It was noticed that cells irradiated during images stack acquisition underwent a redistribution of the rhodamine signal from endosomal compartments to cytosol and nucleus. After around 30 sec/1 min of irradiation using the 545/30 nm filter, F-PNA-R and L-PNA-R enjoyed an escape from the vesicles and diffused within the cells, including penetration into the nucleus. This phenomenon, referred to as PhotoChemical Internalization (PCI), is well illustrated by the pre-internalization and post-PCI fluorescence images (Figure 3A) and the time-lapse movies (Supporting Figure 5) of F-PNA-R and L-PNA-R treated HeLa cells. The same observations were made using Caco2 and RPE1 cell lines (data not shown). The PCI-based approaches make use of photosensitizers, often based on porphyrine structures, which localize into endosome/lysosome membranes, the latter being weakened and made leaky upon light irradiation and subsequent formation of reactive oxygen species.

Since the phenomenon observed here is light-dependent and since the flavin and the lumichrome molecules do not absorb light at the excitation wavelength of 545nm, as does rhodamine (Supporting Figure S1), the latter is likely to be the photosensitizer responsible for PCI. Rhodamine is not a commonly used PCI agent even if such property was recently suggested (Gillmeister et al, 2011). To directly test the ability of rhodamine to promote PCI-effect *i.e.* to photoinduce damages to a lipid bilayer and permeate it, an *in vitro* experiment using small unilamellar vesicles (SUV) was performed. SUV were made with dioleoyl-sn-phosphatidylcholine (DOPC) lipids in the absence or in the presence of L- α -phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) lipids (Rho-Lip) and a fluorescent solution containing carboxyfluorescein was encapsulated. Upon irradiation at 545nm, at which wavelength rhodamine absorbs, an increased release of carboxyfluorescein is observed from SUV containing Rho-Lip compared to SUV lacking Rho-Lip (Figure 3B) and

light irradiation is required for such a release.

Approaches have been previously developed for PNA delivery, including conjugation of PNA with various chemical moieties used as carriers. Here we show that flavin and lumichrome allow PNA uptake within cells, demonstrating the potential of an alloxazine ring to act as a carrier in the context of a PNA conjugate. The possibility to use the lumichrome, a flavin analog lacking redox activity, could be useful to avoid aspecific cellular damages. In both cases, flavin or lumichrome conjugates, uptake involves an endocytic pathway with a vesicular localization of the conjugate that is predominantly observed to be the same as for dextran. However, the endosomal trafficking processes are extremely complex and many of them can be at work simultaneously for the uptake of one given biomolecule.

Nevertheless, our data on the uptake mechanisms of the PNA-flavin and PNA-lumichrome conjugates support two conclusions. First, the uptake pathway of F-PNA-R and L-PNA-R differs from that of cargo-free riboflavin and lumichrome, since RCP does not seem to be involved. In addition, no inhibition of F-PNA-R or L-PNA-R cellular internalization by riboflavin or lumichrome, present in a 10-fold excess, could be observed (data not shown). This result is consistent with observations made previously with riboflavin-albumin (Holladay et al, 1999) and riboflavin-PAMAM dendrimers (Thomas et al, 2010) conjugates, the endocytic uptake for a given carrier being often described as strongly dependent on the attached cargo. Second, internalized PNA-flavin and PNA-lumichrome are mainly retained in endosome/lysosome compartments and are then amenable to appropriate disrupting strategies.

To allow nuclear-cytosolic distribution of PNA, we exploited the PCI effect, but in an unusual way. Indeed, the photosensitizer is attached to the biomolecule of interest (here a PNA) and not used in combination (for example, Shiraishi & Nielsen, 2006), and the photosensitizer, namely the rhodamine, is known to produce low levels of reactive oxygen species as compared to porphyrin derivatives that are commonly used in PCI approaches. Since studies suggest that PCI efficiency strongly depends on photosensitizer-membrane interactions (Berg et al, 2007), our data demonstrate that flavin or lumichrome conjugation is appropriate, to correctly position a rhodamine moiety, for further membrane permeation and PNA release. Consequently such doubly functionalized conjugates, with flavin derivatives and rhodamine, may help to limit oxidative injury to PNA-containing vesicles and aspecific photo-toxicity.

In conclusion, our results provide a novel strategy for incorporating PNAs into eukaryotic, including human cells, allowing them to reach both the cytosol and the nucleus. This requires a double functionalization of PNAs: (i) an alloxazine ring which drives the PNA through the membranes into intracellular endosomes/lysosomes; (ii) a rhodamine dye which upon irradiation facilitates the release of the PNA from the endosomes to the cytosol and the nucleus of the cell. Further experiments are needed to better understand the mechanisms of flavin- or lumichrome-dependent transport of PNAs through membranes, as well as the rhodamine-dependent photochemical internalization process, allowing to further optimize the conjugate design for improved biological activity.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author: giovanna@mnhn.fr

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Lionel Dubost and Arul Marie for mass spectrometry analysis.

REFERENCES

- Bareford, L.M., Phelps, M.A., Foraker, A.B., and Swaan, P.W. (2008). Intracellular processing of riboflavin in human breast cancer cells. *Mol Pharm* 5, 839-848.
- Bauman, J., Jearawiriyapaisarn, N., and Kole, R. (2009). Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. *Oligonucleotides* 19, 1-13.
- Berg, K., Folini, M., Prasmickaite, L., Selbo, P.K., Bonsted, A., Engesaeter, B.O., Zaffaroni, N., Weyergang, A., Dietze, A., Maelandsmo, G.M., *et al.* (2007). Photochemical internalization: a new tool for drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol* 8, 362-372.
- Foraker, A.B., Khantwal, C.M., and Swaan, P.W. (2003). Current perspectives on the cellular uptake and trafficking of riboflavin. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1467-1483.
- Gillmeister, M.P., Betenbaugh, M.J., and Fishman, P.S. (2011). Cellular Trafficking and Photochemical Internalization of Cell Penetrating Peptide Linked Cargo Proteins: A Dual Fluorescent Labeling Study. *Bioconjug Chem*.
- Holladay, S.R., Yang, Z., Kennedy, M.D., Leamon, C.P., Lee, R.J., Jayamani, M., Mason, T., and Low, P.S. (1999). Riboflavin-mediated delivery of a macromolecule into cultured human cells. *Biochim Biophys Acta* 1426, 195-204.
- Lebleu, B., Moulton, H.M., Abes, R., Ivanova, G.D., Abes, S., Stein, D.A., Iversen, P.L., Arzumanov, A.A., and Gait, M.J. (2008). Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 517-529.
- Mason, C.W., D'Souza, V.M., Bareford, L.M., Phelps, M.A., Ray, A., and Swaan, P.W. (2006). Recognition, co-internalization, and recycling of an avian riboflavin carrier protein in human placental trophoblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 465-472.

Said, H.M., Wang, S., and Ma, T.Y. (2005). Mechanism of riboflavin uptake by cultured human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells: possible regulation by an intracellular Ca²⁺-calmodulin-mediated pathway. *J Physiol* *566*, 369-377.

Shiraishi, T., and Nielsen, P.E. (2006). Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. *FEBS Lett* *580*, 1451-1456.

Simon, P., Decout, J.L., and Fontecave, M. (2006). Sequence-specific nucleic acid damage induced by peptide nucleic acid conjugates that can be enzyme-activated. *Angew Chem Int Ed Engl* *45*, 6859-6861.

Thomas, T.P., Choi, S.K., Li, M.H., Kotlyar, A., and Baker, J.R., Jr. (2010). Design of riboflavin-presenting PAMAM dendrimers as a new nanoplatform for cancer-targeted delivery. *Bioorg Med Chem Lett* *20*, 5191-5194.

Turner, J.J., Ivanova, G.D., Verbeure, B., Williams, D., Arzumanov, A.A., Abes, S., Lebleu, B., and Gait, M.J. (2005). Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res* *33*, 6837-6849.

Figure Legends

Figure 1. Structure of the molecules reported herein. The lumichrome-PNA-rhodamine (L-PNA-R) and flavin-PNA-rhodamine (F-PNA-R) conjugates **2** were obtained by reaction of the tetramethylrhodamine, TAMRA, (R) activated ester with the PNA-lumichrome or PNA-flavin conjugate, respectively. Lumichrome **8** (L) was obtained in 5 steps: a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_5\text{COOMe}$, K_2CO_3 , DMF (97%); b) $\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+$, Pd/C, MeOH (50%); c) 6-chlorouracil, H_2O /dioxane 1/1 ; d) NaOH 3M, H_2O (66%); e) NaNO_2 , Acetic acid (92%); f) Dithiothreitol, DMF (90%). **1**, flavin (F) with a carboxylic acid chain on N^{10} instead of a ribityl chain as in the natural riboflavin.

Figure 2. Uptake and intracellular distribution of PNA-flavin and PNA-lumichrome conjugates. HeLa cells were treated by $1.5 \mu\text{M}$ of F-PNA-R, L-PNA-R or PNA-R for 1h, 2h or 3h and then either observed under a microscope immediately or 19h post-treatment (24h time point) for red fluorescence and phase contrast (**A**) or analyzed by flow cytometry (**B**) (see Methods).

Figure 3. Photochemical Internalization of flavin-PNA-rhodamine and lumichrome-PNA-rhodamine conjugates and rhodamine-mediated permeation study on SUV. (A) F-PNA-R or L-PNA-R treated HeLa cells were continuously irradiated using the microscope red filter and acquisition was done following 40ms (Preinternalization; *left column*) or 1min20s (Post-photochemical internalization; *right column*) of irradiation. **(B)** SUV made of DOPC or DOPC/ Rhodamine-Lipid (DOPC-Rho) were irradiated or not for 10min (+/- IR) through the red filter used for microscopy studies, and the percentage of carboxyfluorescein (CF) light-induced release was immediately determined by fluorescence spectroscopy (see Methods for details).

Figure 1

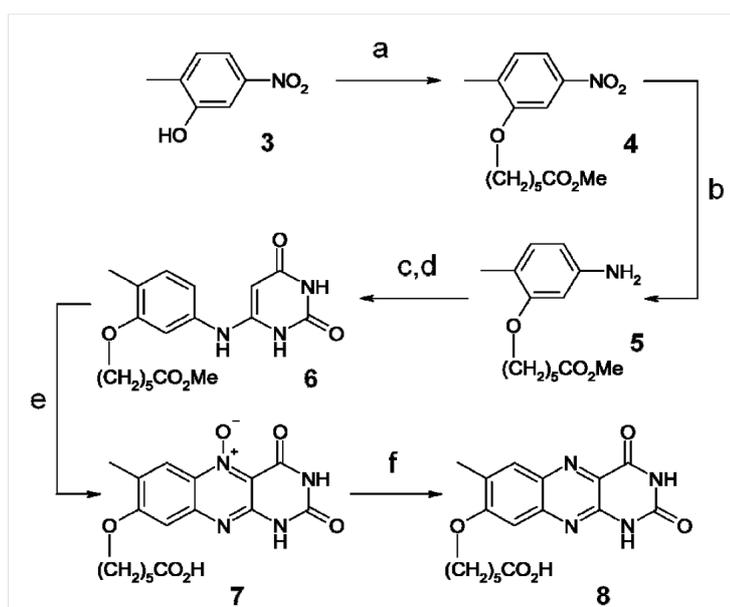
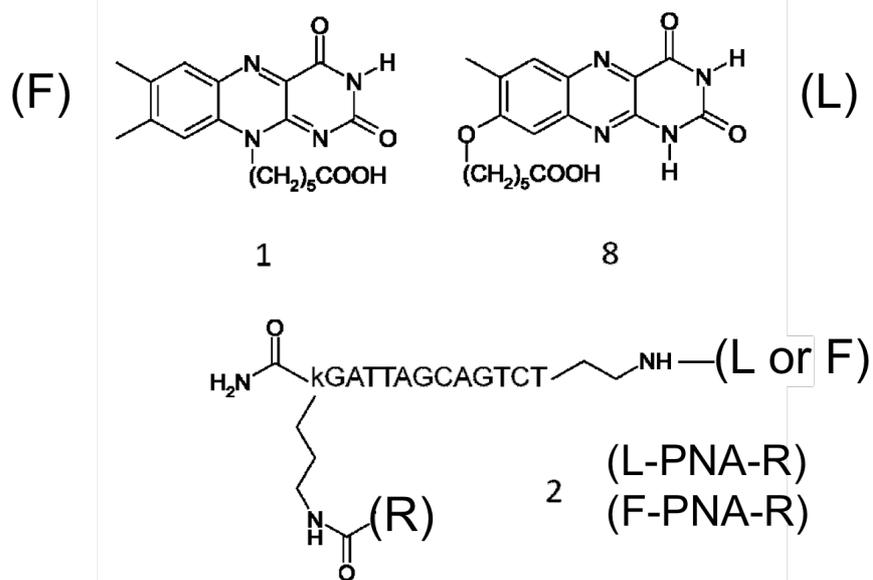


Figure 2

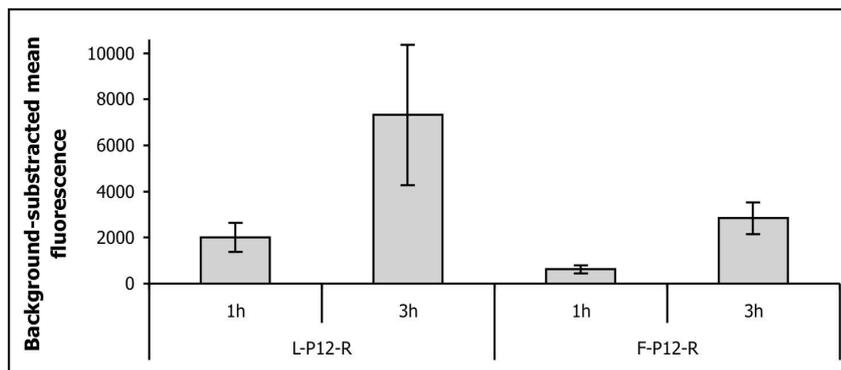
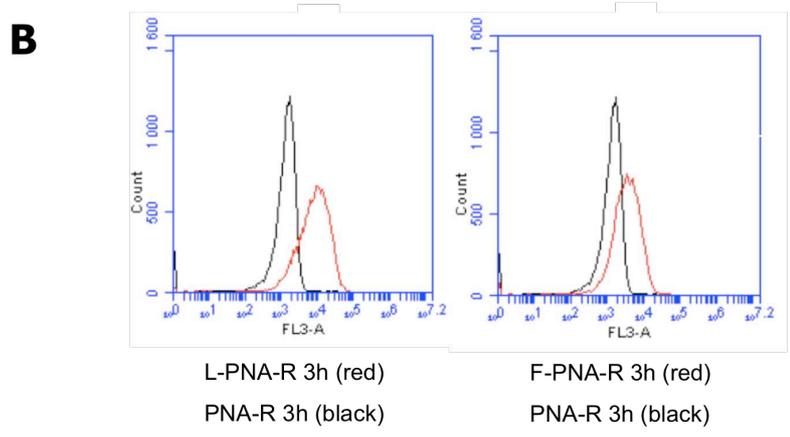
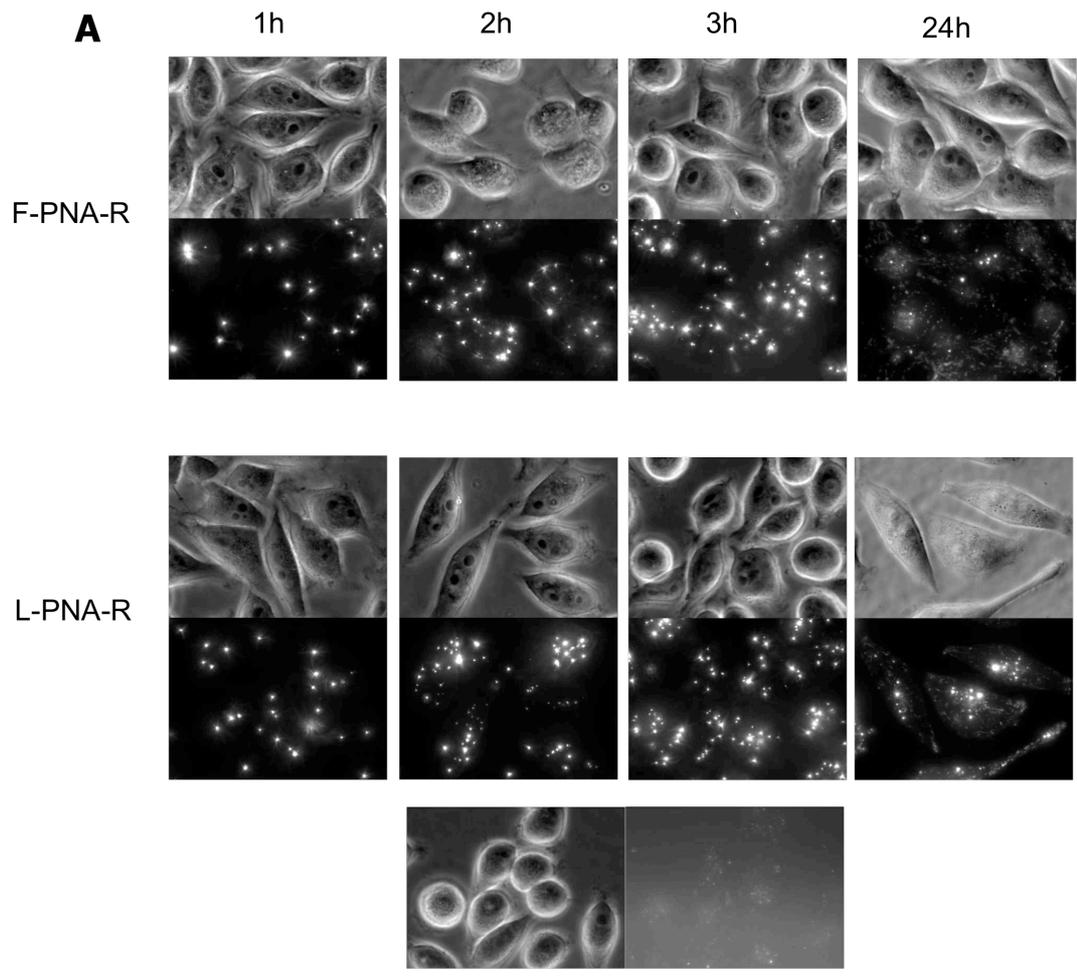
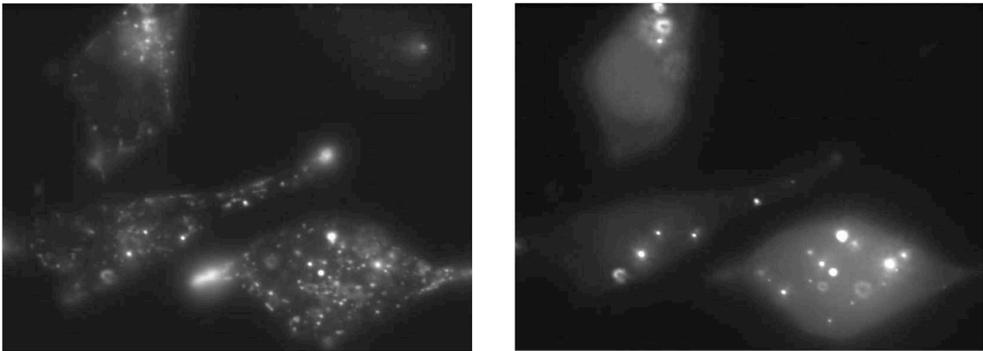


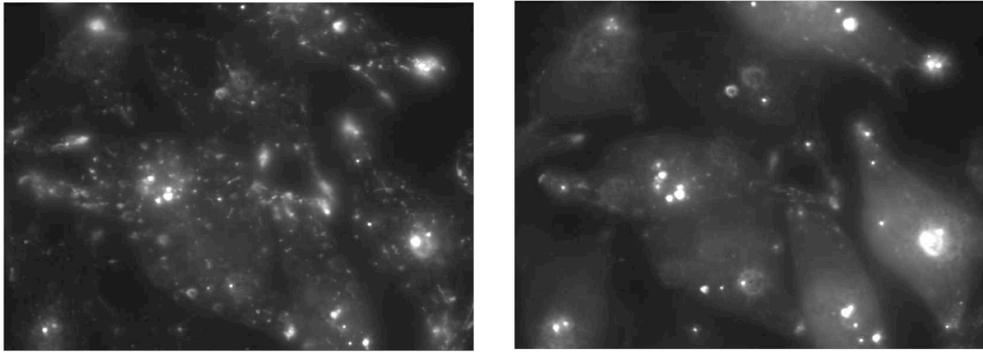
Figure 3

A

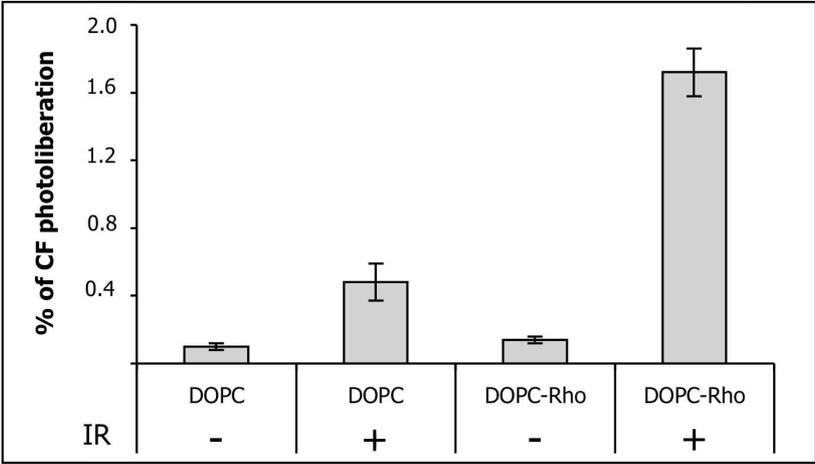
F-PNA-R



L-PNA-R



B



Supporting Information

Contents:

- **Figures S1 to S5**
- **Experimental Methods**
- **Supporting References**

Figure S1. Normalized absorbance spectra (A) of lumichrome, flavin, rhodamine, and **(B)** of rhodamine conjugates, PNA-R and L-PNA-R, used in this study (Absorb. Max = 548 nm, 560 nm or 562 nm, for TAMRA, PNA-R or L-PNA-R, respectively).

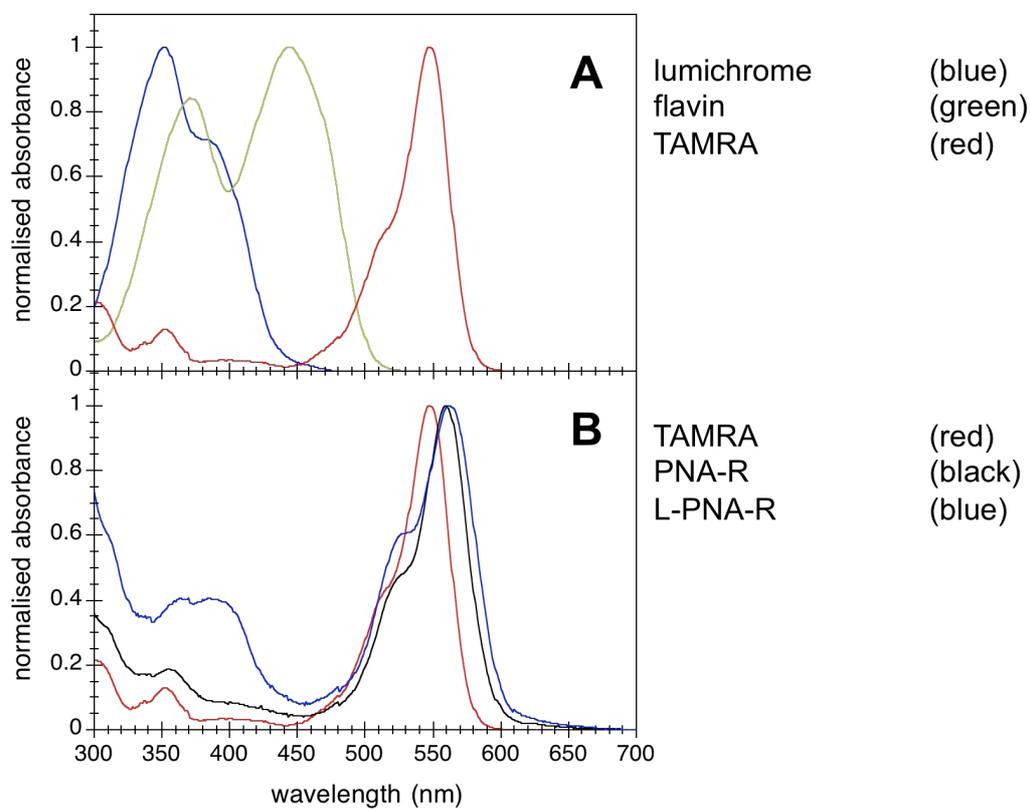


Figure S2. PNA-flavin and PNA-lumichrome conjugates uptake in RPE1, Caco2 and COS-1 cells. Cells were treated by 1.5 μ M of F-PNA-R, L-PNA-R or PNA-R for 3h and imaged under the fluorescence microscope (phase-contrast and red filter).

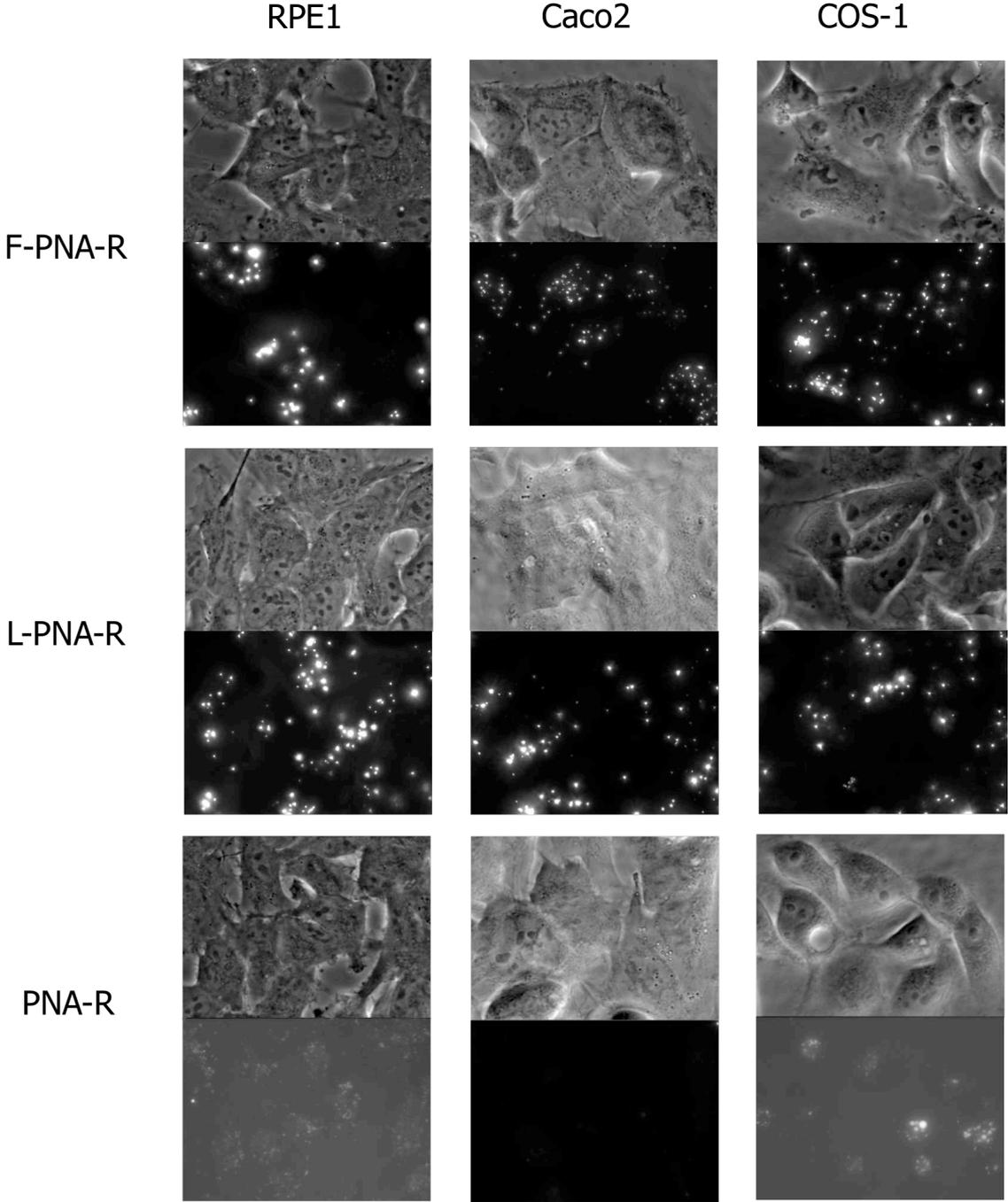


Figure S3. Energy dependence of PNA conjugates uptake and intracellular localization. (A) HeLa cells were treated by 2 μM of F-PNA-R or 1.5 μM of L-PNA-R for 1h at 4°C or at 37°C in the presence or not of 10 mM sodium azide and 6 mM 2-deoxy-D-Glucose, as indicated. Fluorescence microscopy and flow cytometry analyses are presented.

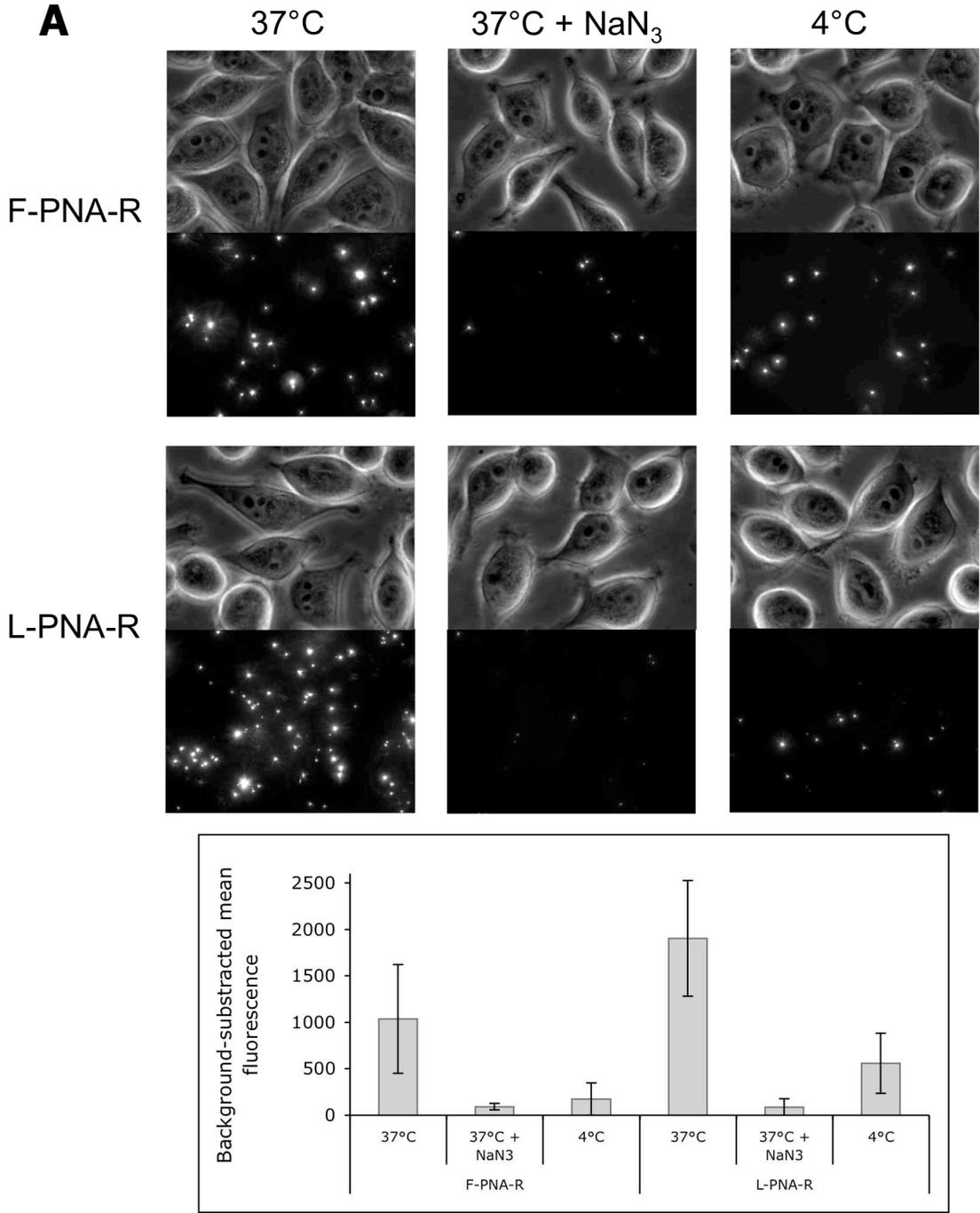


Figure S3. Energy dependence of PNA conjugates uptake and intracellular localization. (B) HeLa cells were incubated with 1.5 μM of F-PNA-R or L-PNA-R and 25 $\mu\text{g/ml}$ of Transferrin-A488, 250 $\mu\text{g/ml}$ of Dextran-A488 or 1 μM of LysoTracker green. Cell imaging was performed immediately after 2h treatment for Transferrin and Dextran, and after 19h incubation and 2h treatment for LysoTracker (see Methods for details). Red and green fluorescence were observed and co-localization of the green marker and red conjugate appeared as yellow vesicles. White arrows point-out some pre-eminent co-localization vesicles.

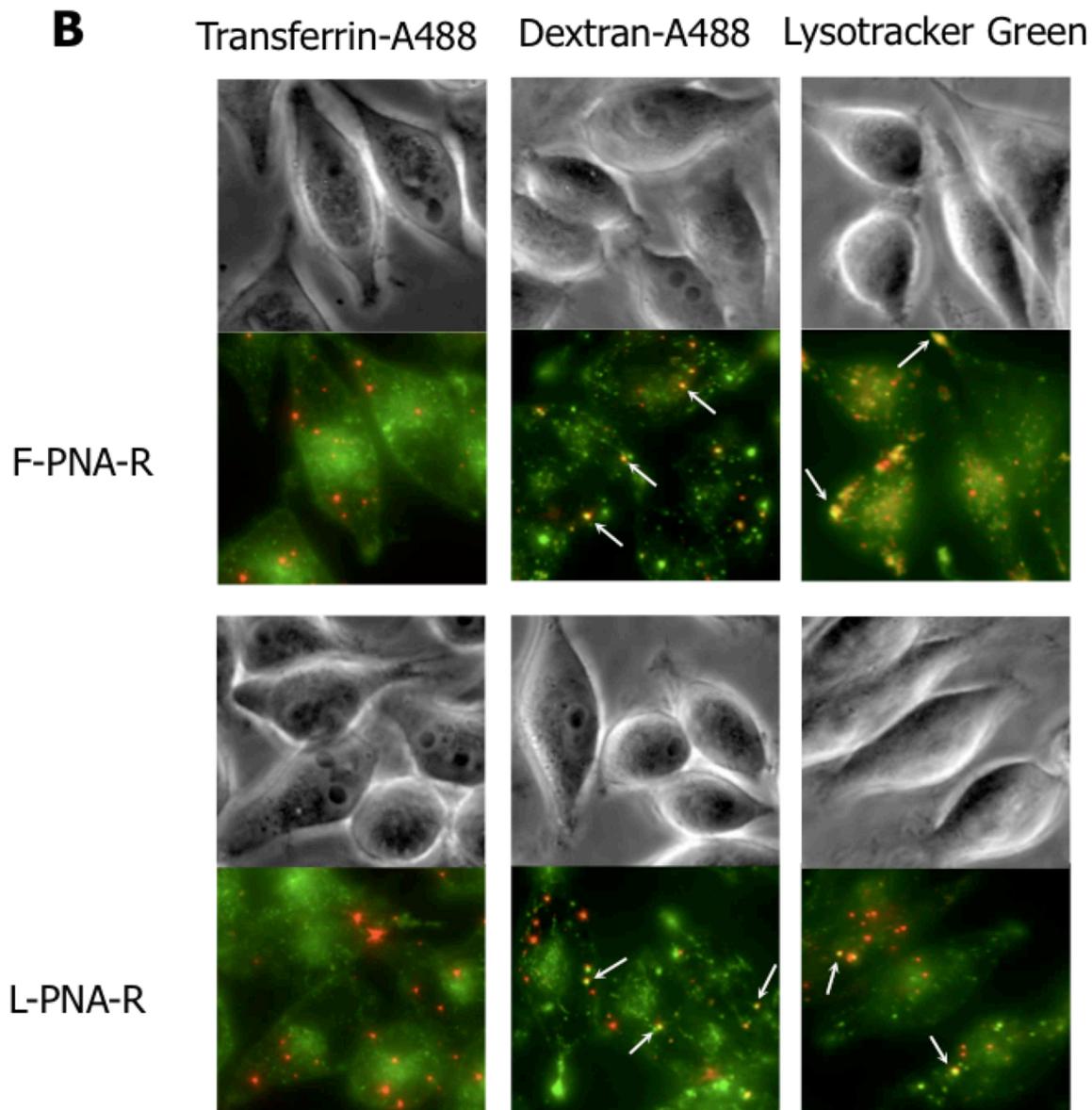


Figure S4. Effect of endosomolytic reagents on intracellular distribution of PNA conjugates. L-PNA-R treated HeLa cells were incubated (or not, CTRL) with 100 μ M of Chloroquine, 1.5 μ M of Primaquine or 25 μ M of Monensin. Red fluorescence was shown (24h incubation followed by 4h treatment) (see Methods for details).

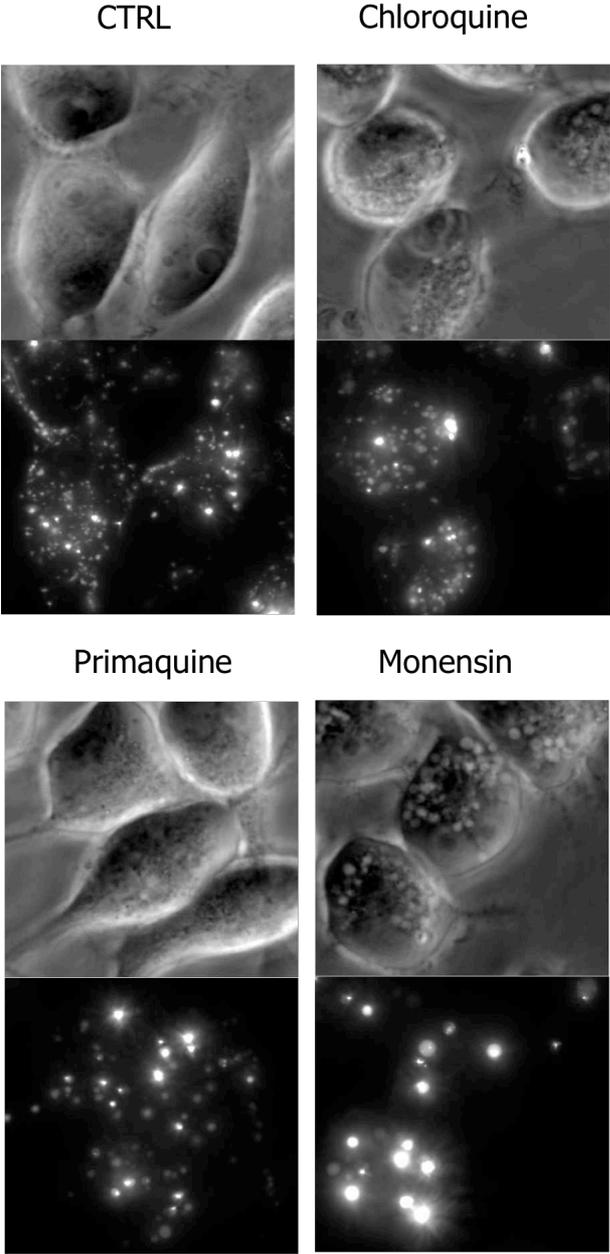


Figure S5. Time-lapse movies of photochemical internalization of flavin-PNA-rhodamine and lumichrome-PNA-rhodamine conjugates. F-PNA-R or L-PNA-R treated HeLa cells were continuously irradiated with the microscope red filter and acquisition was done every 10s (see Methods for details).

Experimental Methods

Chemical Synthesis.

A) Lumichrome derivative (compound 8)

6-(2-Methyl-5nitro-phenoxy)-hexanoic acid methyl ester 4: To a solution of 2-methyl-5-nitrophenol **3** (3.9 g ; 25.5 mmol) in DMF (20 mL) refluxed under Argon, potassium carbonate (17.6 g ; 127.5 mmol) and 6-bromohexanoic acid methyl ester (8 g ; 38.3 mmol) were added with stirring. The mixture was refluxed for 30 min and was filtered after cooling. After evaporation, the residue was dissolved in dichloromethane and the solution was extracted three times by water. After purification by column chromatography on silica gel, the organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated. The compound **4** was isolated (6.97 g ; 24.8 mmol ; 97.3 %). Mp: 47 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (1H, dd, ArH), 7.60 (1H, s, ArH), 7.22 (1H, d, ArH), 4.03 (2H, t, CH₂O), 3.66 (3H, s, COOCH₃), 2.34 (2H, t, CH₂COO), 2.27 (3H, s, CH₃), 1.85 (2H, m, 2CH₂), 1.71 (2H, m, 2CH₂), 1.53 (2H, m, CH₂). MS (ESI⁺) m/z : 282 ([M+H]⁺).

6-(5-Amino-2-methyl-phenoxy)-hexanoic acid methyl ester 5: A mixture of compound **4** (6 g ; 21.4 mmol) and palladium on charcoal 5% (120 mg) was refluxed in methanol (40 mL). Ammonium formate (12.2 g ; 193.6 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 55°C for 1 hour. After cooling, the mixture was filtered and reduced under vacuum. The residue was dissolved in diethylether and the solution was extracted three times by water. After purification by column chromatography on silica gel, the compound **5** was obtained after evaporation (2.68 g ; 10.7 mmol ; 50 %). Mp: 94 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.86 (1H, d, ArH), 6.17 (2H, ms ArH), 3.88 (2H, t, CH₂O), 3.65 (3H, s, COOCH₃), 3.47 (2H, s, ArNH₂), 2.34 (2H, t, CH₂COO), 2.07 (3H, s, CH₃), 1.79 (2H, m, 2CH₂), 1.70 (2H, m, 2CH₂), 1.51 (2H, m, CH₂). MS (ESI⁺) m/z : 252 ([M+H]⁺).

6-(4-methyl-3-(6-O-carboxylhexyloxy)aniline)uracile 6: To a solution of compound **5** (2.3g, 9.3 mmol) in 1,4-dioxane/water (1:1, 20 mL) refluxed under argon, 6-chlorouracil (1 g, 6.9 mmol) was added with stirring. The mixture was refluxed for 48 h increasing at regular intervals pH near to 7.5 by addition of aqueous NaOH 3M. After cooling, aqueous NaOH was added until pH 13 and the solution was stirred for 8 h and then extracted with dichloromethane. Compound **6** was precipitated from the aqueous solution by addition of 6M aqueous hydrochloric acid to reach pH 1. After filtration and washing with water and, then, diethylether, compound **6** was isolated (2.14 g, 6.2 mmol, 66.2 %). Mp: 207 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.35 (1H, s, NH), 8.20 (1H, m, NH), 7.10 (1H, d, ArH), 6.73 (1H, s, ArH), 6.67 (1H, d, ArH), 4.65 (1H, s, CH), 3.95 (2H, t, CH₂O), 2.22 (2H, t, CH₂COO), 2.11 (3H, s, CH₃), 1.73 (4H, m, 2 CH₂), 1.56 (2H, m, CH₂), 1.46 (2H, m, CH₂). MS (ESI⁺) m/z : 348 ([M+H]⁺).

8-(6-carboxylhexyloxy)-alloxazine-5-oxide 7: Sodium nitrite (560 mg, 8.2 mmol) was added in the dark to a solution of compound **6** (1.5g, 4.3 mmol) in acetic acid (10 mL) cooled in an ice bath. The mixture was stirred at room temperature for 5 h, and then water (2 mL) was added. The suspension was stirred again for 3 h, and then was evaporated to dryness. After addition of water and filtration, the solid was washed with water and then diethylether. Compound **7** was obtained as a yellow powder (0.79 g, 2.1 mmol, 92.5 %). Mp: 261 °C (dec); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.74 (1H, s, NH), 11.57 (1H, s, NH), 8.11 (1H, s, ArH), 7.10 (1H, s, ArH), 4.20 (2H, t, CH₂O), 2.38 (3H, s, CH₃), 2.25 (2H, t, CH₂COO), 1.84 (2H, m, 2 CH₂), 1.62 (2H, m, CH₂), 1.52 (2H, m, CH₂). MS (ESI⁺) m/z : 375 ([M+H]⁺).

8-(6-carboxylhexyloxy)-alloxazine 8: Dithiothreitol (1,38 g, 9 mmol) was added to a solution of *N*-oxide 7 (0.61 g, 1.63 mmol) in DMF (60 ml). The mixture was refluxed with stirring for 12 h under argon. The cooled solution was stirred at room temperature for 10 h and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in a minimum volume of aqueous 3M NaOH. Aqueous 6M HCl was added for precipitation of compound 8. After filtration and washing with water and then diethylether, pure compound 8 was obtained (530 mg, 1.5 mmol, 90%). Mp 252 °C (dec); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.95 (1H, s, COOH), 11.74 (1H, s, NH), 11.57 (1H, s, NH), 7.89 (1H, s, ArH), 7.16 (1H, s, ArH), 4.20 (2H, t, CH₂O), 2.35 (3H, s, CH₃), 2.25 (2H, m, CH₂COO), 1.83 (2H, m, 2 CH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 1.51 (2H, m, CH₂). HRMS (CI) Calcd. for C₁₇H₁₉N₄O₅ [M+H]⁺: 359.1355, Found: 359.1343.

B) PNA derivatives

PNA-flavin conjugates were synthesized as described previously¹.

PNA-lumichrome conjugate.

To a solution of lumichrome 8 (4 mg, 11 μmol) in DMF (2 mL), DIPEA (0.1 mL), 2,6-lutidine (0,1 ml) and HATU (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate; 4 mg, 11 μmol) were added under argon. The resulting solution was stirred for 15 min and, then, was added under argon to the protected PNA on the solid support (PNA synthesis at 2 μM scale). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and filtered. The beads were washed with DMF and, then, diethyl ether. The PNA-flavin conjugate was cleaved from the solid support with concomitant deprotection by treatment with TFA/*m*-cresol (3:1) for 1 h. The mixture was filtered and, then, diethyl ether was added to the solution to precipitate the PNA-lumichrome conjugate. HPLC purification was carried out on a C₁₈ reversed-phase X-bridges column (Waters, 10 x 250 mm). Elution was performed at 60°C by building up the following gradient at a flow rate of 2 mL min⁻¹ from 0.1% aqueous TFA to 0.1% TFA in acetonitrile (detection at 260 and 350 nm).

Rhodamine-PNA-flavin and rhodamine-PNA-lumichrome conjugates 2.

To a solution of PNA-flavin or PNA-lumichrome conjugate in DMF/H₂O (1,5 ml) were added 50 μl of DIPEA and 25 μl of a solution of 5-Carboxy-tetramethylrhodamine N-succinimidyl ester (Sigma-Aldrich). After one night at 50°C the modified PNA were purified by HPLC as described above (detection at 260, 350 and 520 nm).

Cell culture.

HeLa and COS-1 cells were cultured in DMEM (Gibco) containing 7% and 10% (v/v) FBS respectively. RPE1 cells were cultured in DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 10% FBS while Caco2 cells were maintained in MEM (Gibco) with 20% FBS. All cell lines were grown at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Cellular internalization studies.

Cell uptake assay. 30,000 HeLa, 15,000 RPE1 or 40,000 Caco2 or COS-1 cells were plated on a 8 well Ibidi μslide (Biovalley) in 200 μl of their respective medium and cultured overnight. The medium was then discarded and cells were briefly washed with PBS (Gibco) and incubated with 1.5 μM of F-PNA-R, L-PNA-R or PNA-R in OptiMEM (Gibco) for 1h to 3h at 37°C. For the 24h time point, the medium was discarded after 3h treatment, cells were washed with PBS and further incubated in fresh appropriate culture medium for 21h at 37°C.

Fluorescence microscopy and flow cytometry. For live cell imaging, incubation medium was discarded and 200 μ l of HBSS were added to cells just before observation with a Leica DMIRE2 fluorescence microscope equipped with red filter (excitation: 545/30 nm, emission: 610/75 nm). Cells were viewed with a Leica 100x oil immersion objective with a numerical aperture of 1.40, fitted with a CoolSNAP HQ monochrome cooled CDD camera (Photometrics-Roper Scientific). Images were captured by Metamorph software and analyzed using Image J. Presented images are z projections of 36 images stack (0.2 μ m between 2 images). To evaluate cell viability, cells were stained with SytoxGreen (Invitrogen) and/or observed by phase-contrast imaging. Under all the conditions used in this work cell viability was above 90%. Representative images of at least three independent experiments are shown and phase-contrast images are presented above fluorescence images.

Alternatively, cells were trypsinized (Gibco), rinsed twice with PBS and analyzed with a C6 flow cytometer (Accuri) using the Cy5 channel (FL3), for quantification of cellular uptake of rhodamine-labelled molecules. Mean fluorescence obtained for F-PNA-R or L-PNA-R, reduced by the one obtained for PNA-rhodamine conjugate (PNA-R, used as a control), is reported (background-subtracted mean fluorescence). Each experiment was repeated at least three times and values were presented as the mean of all independent experiments ; error bars represent (+/-)SD.

Energy dependance studies . HeLa cells were incubated with 1.5 μ M of L-PNA-R or 2 μ M of F-PNA-R in OptiMEM either for 1h at 4°C or with 10 mM Sodium Azide (Acros Organics) and 6 mM 2-deoxy-D-Glucose (Sigma), for 1h at 37°C. Cells were then observed with a fluorescence microscope and analyzed by FACS.

Intracellular localization studies. HeLa cells were incubated with 1.5 μ M of F-PNA-R or L-PNA-R and 25 μ g/ml of Transferrin-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) or 250 μ g/ml of Dextran-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) in OptiMEM for 2h at 37°C.

For colocalization with LysoTracker, HeLa cells were incubated with 1.5 μ M of PNA conjugates in OptiMEM for 3h at 37°C and then further incubated in fresh DMEM with 7% FBS for 19h at 37°C. At that point, cells were complemented with 1 μ M of LysoTracker Green DND-26 (Invitrogen) in OptiMEM and incubated for 2h at 37°C.

Cells were then observed under the microscope equipped with red and green (excitation: 480/40 nm, emission: 527/30 nm) filters.

Uptake competition by flavins. HeLa cells were incubated with 1.5 μ M of fluorescent conjugates in the presence of 15 μ M of riboflavin or lumichrome in OptiMEM for 1h at 37°C. Cells were then analyzed by FACS.

Endosomolytic agents treatment. HeLa cells were incubated with 1.5 μ M of L-PNA-R in OptiMEM for 3h at 37°C and then further incubated in fresh DMEM and 7% FBS for 19h at 37°C. Cells were then treated by 100 μ M Chloroquine, 25 μ M Monensin or 1.5 μ M Primaquine (all from Sigma) in OptiMEM for 4h at 37°C and then viewed on the microscope.

Photochemical internalization.

The movies illustrating the time-dependent photochemical internalization of PNA conjugates were performed on HeLa cells, 24h post-treatment by 1.5 μ M of F-PNA-R or L-PNA-R for 3h. Cells were irradiated continuously with the red filter at 545/30 nm and image acquisition was done every 10 seconds. The video was edited with Image J.

Absorbance spectroscopy.

Dyes absorption spectra were recorded at room temperature, on a Uvikon 940 (Kontron), at a concentration of about 100 μ M for lumichrome and flavin, 10 μ M for TAMRA and 10 μ M for PNA conjugates. Experiments were performed in 10 mM cacodylic acid pH 7.2 (LiOH) and 100 mM NaCl, in 1 cm optical path length quartz cells.

Preparation of the small unilamellar vesicles (SUV) and study of membrane permeation mediated by rhodamine.

SUV were prepared according to the well-documented method of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate filters of defined pore size²⁻⁶. Briefly, either Dioleoyl-sn-phosphatidylcholine (DOPC) or L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rho-Lip) (both from Avanti Polar Lipids) were used to prepare SUV. A solution of lipids (DOPC or DOPC/Rho-Lip mixture with a 100/1 ratio) in chloroform was taken to dryness. The lipid film obtained was rehydrated in 20 mM PBS pH 7.4 containing 50 mM of carboxyfluorescein (CF, Sigma Aldrich). The liposome suspension was extruded 10 times through a polycarbonate membrane filter (Poretics) with a pore size of 100 nm using an mini-extruder device (Avanti Polar Lipids). The vesicle diameter was 135 ± 30 nm^{4,7}. The vesicles were separated from non-encapsulated CF by gel filtration with Sepharose (GE Healthcare Bio-Science).

Samples containing 0.5 mM DOPC were prepared in PBS and irradiated at room temperature with a 150 W Xenon arc mounted in a lamp housing equipped with a rear reflector. The irradiation wavelength was selected by using an interference filter corresponding to the Leica red filter used for microscopy PCI study on cells (centered at 545 nm with a bandwidth of 30 nm). The irradiation beam was focused on the sample and the irradiance of the incident light was measured, with a typical value of around 75 mW.

Immediately after 10 min of irradiation, the kinetics of CF release, which is signed by a fluorescence increase, was measured by an Aminco Bowman Series 2 spectrofluorimeter (Edison). Excitation and emission wavelengths were 490 nm and 520 nm, respectively. After the kinetics measurement, Triton X-100 (Sigma Aldrich) was added to induce the rupture of the vesicles. The fluorescence intensity corresponding to complete release of CF following Triton X-100 treatment was then used for normalization. Presented data are the mean of 2 independent experiments (+/-SD).

Supporting References.

- (1) Simon, P ; Decout, J.L. ; Fontecave M. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, *45*: 6859-6861.
- (2) Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R. *Biochim Biophys Acta* **1985**, *812*, 55-65.
- (3) Kuzelova, K.; Brault, D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9447-59.
- (4) Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. *Biochim Biophys Acta* **1986**, *858*, 161-8.
- (5) Nayar, R.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. *Biochim Biophys Acta* **1989**, *986*, 200-206.
- (6) Olson, F.; Hunt, C. A.; Szoka, F. C.; Vail, W. J.; Papahadjopoulos, D. *Biochim Biophys Acta* **1979**, *557*, 9-23.
- (7) Mojzisoava, H.; Bonneau, S.; Maillard, P.; Berg, K.; Brault, D. *Photochem Photobiol Sci* **2009**, *8*, 778-87.

2.3 Internalisation cellulaire de différents conjugués fluorescents

Suite à l'étude réalisée avec les conjugués F-P12-R et L-P12-R et dans l'objectif de comprendre les résultats négatifs obtenus en pénétration libre avec les conjugués ciblant la séquence PPT (paragraphe 1.5), les conjugués fluorescents F-13C-R, L-13C-R, F-13T-R, L-13T-R, F-18L-R et L-18L-R, ainsi que leurs contrôles respectifs (13C-R, 13T-R et 18L-R), ont à leur tour été synthétisés et testés pour évaluer leur internalisation en cellules.

De manière surprenante, aucune internalisation significative n'a pu être observée en microscopie de fluorescence, ni quantifiée au cytomètre, suite à l'incubation des cellules HeLa 1002 avec l'un de ces six conjugués, dans des conditions expérimentales similaires à celles utilisées pour les conjugués P12. L'augmentation du temps d'incubation ainsi que l'augmentation de la concentration en conjugués (jusqu'à 10 μ M) n'a pas permis de détecter une différence nette de signal entre les cellules traitées par les contrôles 13T-R, 13C-R ou 18L-R d'une part, et les cellules traitées par les conjugués fluorescents Flavine ou Lumichrome correspondants d'autre part. Ces trois ON ne sont donc pas internalisés dans les cellules HeLa, contrairement au PNA P12, ce qui explique le manque d'activité des conjugués testés en pénétration libre (paragraphe 1.5). Il est intéressant de remarquer que la séquence de ces ON est totalement ou très majoritairement de nature pyrimidique alors que la séquence de P12 est mixte, composée à la fois de purines et de pyrimidines.

Afin de tester l'hypothèse d'un lien entre l'internalisation cellulaire d'un conjugué et la nature des bases composant le PNA, quatre conjugués F-PNA-R de séquence mixte, nommés F-P1-R, F-P2-R et F-P3-R ainsi que leurs conjugués contrôles P1-R, P2-R et P3-R ont également été synthétisés (Table 2.1).

Les profils observés en microscopie et au cytomètre de cellules HeLa après 3 heures d'incubation en présence de 0.5 μ M de F-P1-R, F-P3-R ou de leur conjugué contrôle respectif sont présentés sur les Figures 2.1 à 2.3. Ces résultats mettent en évidence une internalisation cellulaire des conjugués F-P1-R et F-P3-R, visible par la présence d'un marquage vésiculaire dans la quasi-totalité des cellules, mais également d'un marquage diffus plus ou moins marqué dans une fraction des cellules et ce, avant irradiation prolongée (non dû à un phénomène de PCI). Il est important de remarquer que de manière identique à ce qui avait été observé pour le conjugué contrôle P12-R, aucun signal significatif n'est détecté dans les cellules traitées par les conjugués P1-R et P3-R. Ces résultats témoignent donc de l'internalisation dépendante de la Flavine de ces deux PNA, et confirment donc les observations faites au cours de l'étude précédente sur le conjugué F-P12-R (chapitre 2.2).

En outre, un phénomène de PCI a également été observé au microscope dans les cellules HeLa incubées avec les conjugués F-P1-R et F-P3-R arborant un marquage vésiculaire avant irradiation (résultats non montrés).

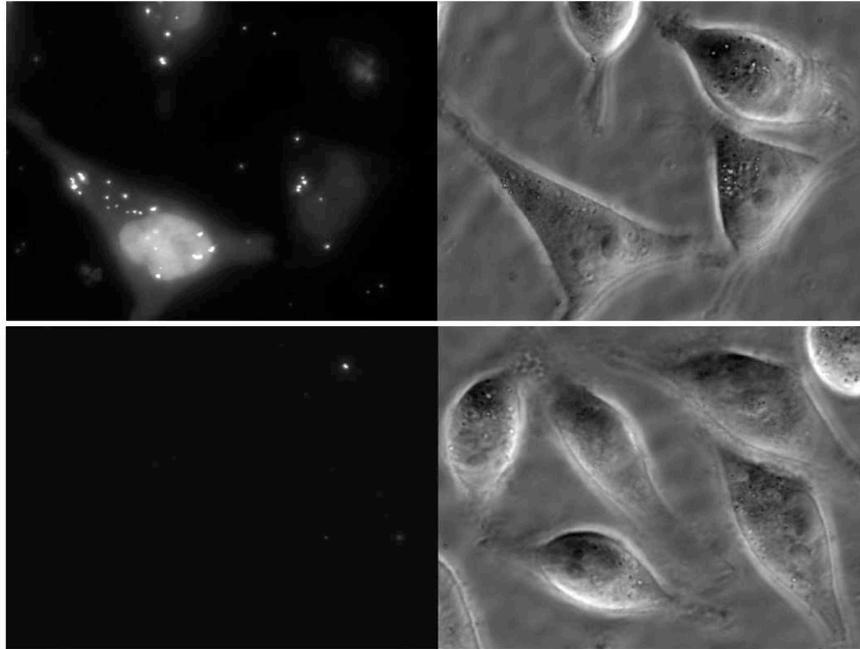


Figure 2.1 : Microscopie de fluorescence sur cellules HeLa incubées pendant 3h avec 0.5 μ M de conjugués F-P1-R (en haut) ou P1-R (en bas)
A droite : lumière blanche, à gauche : signal Rhodamine ; temps d'exposition : 30ms

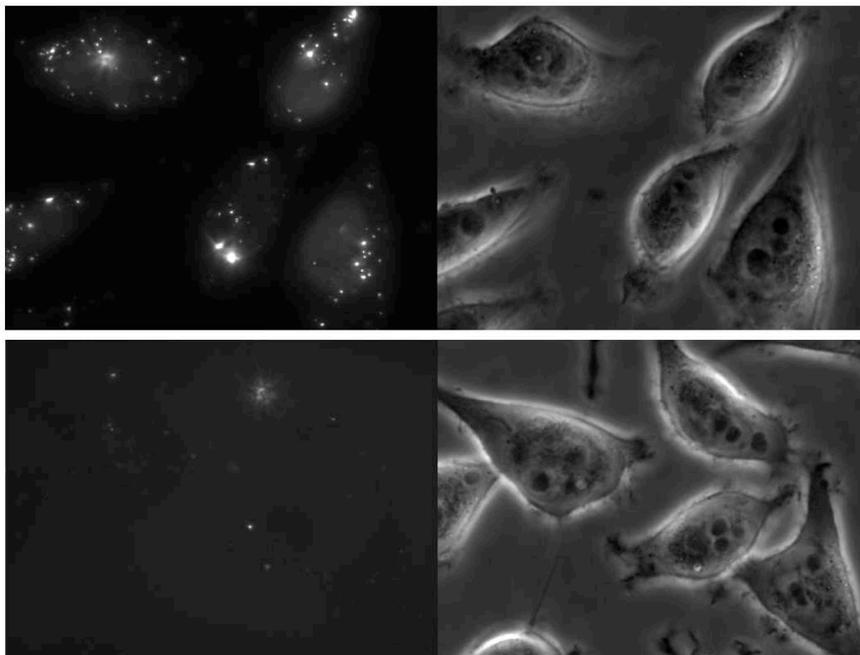


Figure 2.2 : Microscopie de fluorescence sur cellules HeLa incubées pendant 3h avec 0.5 μ M de conjugués F-P3-R (en haut) ou P3-R (en bas)
A droite : lumière blanche, à gauche : signal Rhodamine ; temps d'exposition : 70ms

En ce qui concerne le conjugué F-P2-R, aucun signal Rhodamine significatif n'a en revanche été détecté dans les cellules incubées en présence de 0.5 μ M ou 1.5 μ M de ce conjugué, comme illustré par la Figure 2.3.

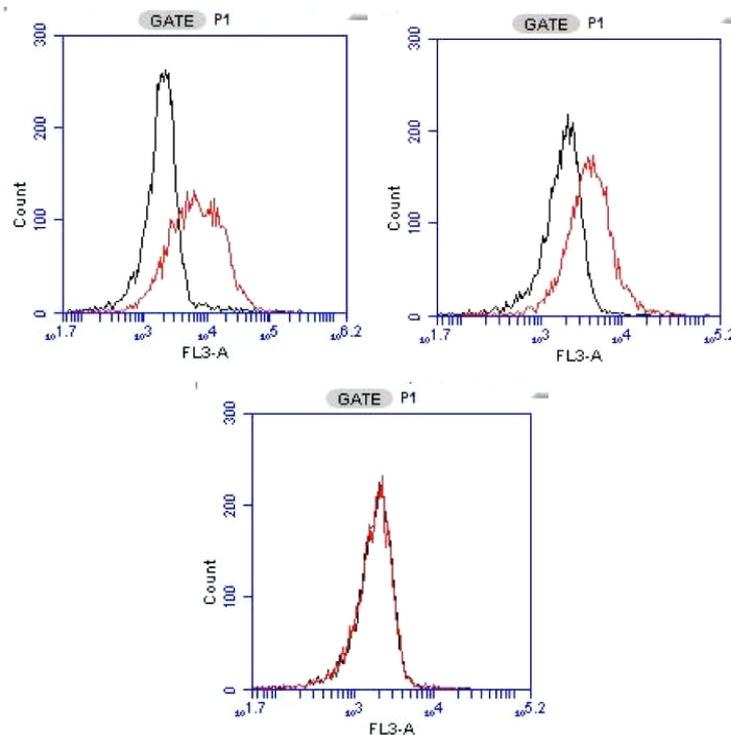


Figure 2.3 : Profils de fluorescence FL3 (rouge) des cellules HeLa après 3h de traitement par 0.5 μ M de conjugués PNA-R (en noir) ou F-PNA-R (en rouge) obtenus au cytomètre

Moyennes de fluorescence FL3 :

En haut à gauche : P1-R : 2826, F-P1-R : 9903

En haut à droite : P3-R : 2018, F-P3-R : 4877

En bas: P2-R : 1815, F-P2-R : 1909

Ces expériences sur différents conjugués Flavine ou Lumichrome - PNA - Rhodamine indiquent que l'internalisation de PNA par des dérivés de la Riboflavine intègre une composante cruciale qui serait la séquence de l'ON.

2.4 Activité des double-conjugués Flavine ou Lumichrome - PNA - Rhodamine sur cellules perméabilisées

L'impact du couplage de la Rhodamine sur l'activité d'un PNA conjugué à la Flavine ou au Lumichrome a été exploré en déterminant l'inhibition de l'activité Luciférase sur cellules HeLa 1002 perméabilisées en présence des conjugués F-13C, L-13C, F-13C-R ou L-13C-R. Les moyennes d'activité Luciférase obtenues pour chacune de ces molécules, exprimées en pourcentage de l'activité Luciférase relevée pour les points non traités (cellules perméabilisées en absence d'ON, NT), sont présentées sur la Figure 2.5.

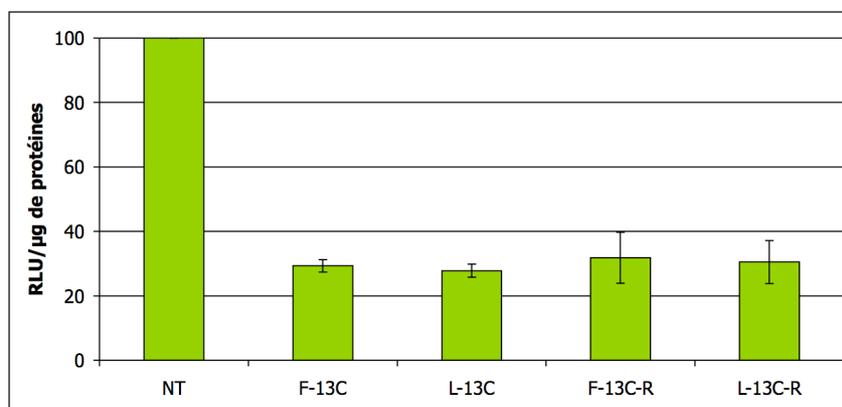


Figure 2.5 : Moyennes de l'activité Luciférase de cellules HeLa 1002 perméabilisées en présence de 10 μ M de conjugués 13C

L'inhibition détectée pour les conjugués fluorescents F-13C-R et L-13C-R est très proche des valeurs obtenues pour les conjugués F-13C et L-13C, soit environ 70% d'inhibition de l'activité Luciférase dans tous les cas. Le couplage à la Rhodamine, possédant des propriétés d'agent PCI, est donc compatible avec l'activité cellulaire d'un PNA bloqueur stérique tel que 13C.

2.5 Discussion

Plusieurs remarques et interrogations peuvent être formulées à l'issue des expériences réalisées dans cette seconde partie du projet.

Conjugués Flavine vs Lumichrome

Il est tout d'abord intéressant de noter que même si les conjugués F-P12-R et L-P12-R donnent des résultats similaires en terme de mécanisme d'entrée (paragraphe 2.2 : article), les moyennes de fluorescence du conjugué Lumichrome semblent quantitativement plus importantes que celles du conjugué Flavine. En effet, d'après les quantifications réalisées au cytomètre sur les lignées HeLa, Caco2 et COS-1, et dans une moindre mesure, au regard des images de microscopie pour ces lignées, le signal Rhodamine de cellules incubées pendant 3h avec 1.5 μ M de L-P12-R est supérieur d'un facteur 2,6 à 5 au signal détecté pour les cellules incubées avec 1.5 μ M de F-P12-R (Figure 2.6).

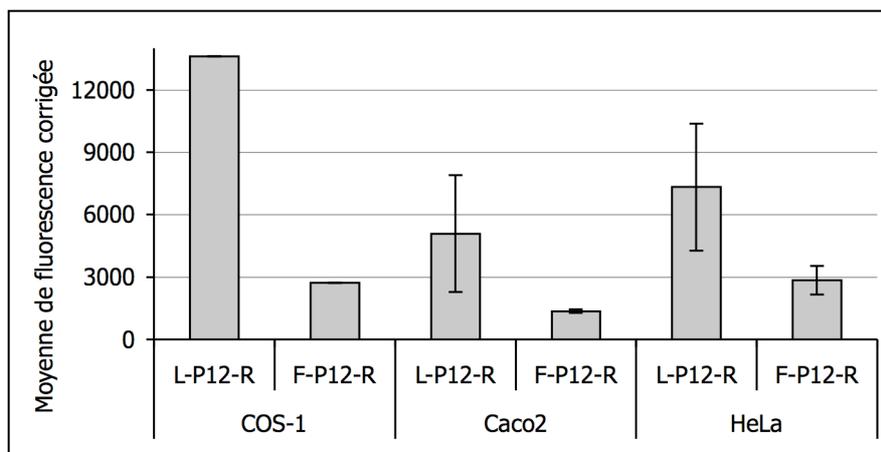


Figure 2.6 : Moyennes de fluorescence FL3 (rouge) déterminées au cytomètre pour les cellules incubées avec L-P12-R ou F-P12-R, après soustraction de la moyenne de fluorescence de cellules incubées avec P12-R dans les mêmes conditions

Ratio des moyennes de fluorescence corrigées L-P12-R/F-P12-R :
5 pour COS-1, 3.8 pour Caco2 et 2.6 pour HeLa

Cette observation, effectuée sur trois lignées cellulaires, suggère une meilleure efficacité d'internalisation du conjugué Lumichrome, par rapport à son équivalent Flavine. Deux paramètres peuvent cependant conduire à un signal fluorescent plus important pour les cellules incubées avec le conjugué Lumichrome, sans que son internalisation soit réellement plus efficace.

Il est tout d'abord possible d'imaginer qu'une altération des propriétés de fluorescence de la Rhodamine se produise lorsque celle-ci est couplée à un conjugué Flavine ou Lumichrome, par interaction du ligand avec des protéines cellulaires par exemple. Si l'on suppose que la fluorescence de la Rhodamine est plus diminuée dans le contexte d'un conjugué Flavine que Lumichrome, le signal Rhodamine détecté au cytomètre, plus faible pour F-P12-R, ne peut alors être comparé au signal détecté pour L-P12-R puisqu'il ne correspond pas à la même quantité de conjugués internalisés dans les deux cas.

On peut en outre avancer, pour expliquer en partie ce phénomène, une détermination approximative de la concentration des stocks de conjugués, du fait de leur mauvaise solubilité, notamment en ce qui concerne les double-conjugués.

Mécanisme d'internalisation par endocytose

Les expériences visant à déterminer le mécanisme d'entrée des conjugués F-P12-R et L-P12-R (paragraphe 2.2 : article) ont permis d'établir que ceux-ci étaient internalisés par endocytose et non par simple translocation. Les expériences de colocalisation dans les cellules HeLa ont également permis de déterminer que les conjugués Flavine et Lumichrome étaient internalisés en partie par une voie d'endocytose similaire à celle empruntée par le Dextran, marqueur de la macropinocytose. Il semble, en revanche, que les conjugués étudiés n'entrent pas par la voie d'endocytose médiée par la clathrine puisqu'aucune colocalisation avec la Transferrine n'a pu être observée.

La macropinocytose consiste en la formation, conduite par l'actine, de protrusions membranaires qui se replient et fusionnent avec la membrane plasmique (Conner and Schmid, 2003). Ce mécanisme conduit à l'internalisation, dans des vésicules de taille supérieure à 0.2µm nommées macropinosomes, de fluide extracellulaire ainsi que de composants membranaires (récepteurs protéiques, radeaux lipidiques) (Kerr and Teasdale, 2009). Le macropinosome formé va alors fusionner avec un endosome précoce avant d'être mûré le plus souvent en endosome tardif puis lysosome, ou encore d'être conduit à la membrane plasmique pour un efflux de son contenu (Jones, 2007). La macropinocytose est généralement considérée comme un mécanisme d'internalisation non spécifique puisque le contenu du macropinosome correspond principalement à la composition du milieu extracellulaire.

Outre la colocalisation avec le Dextran, la taille relativement élevée des vésicules formées suite à l'internalisation des conjugués fluorescents, ainsi que leur colocalisation partielle avec le LysoTracker à des temps tardifs, sont des éléments cohérents avec une entrée par macropinocytose. En revanche, l'endocytose des conjugués F-P12-R et L-P12-R par simple

absorption de milieu extracellulaire et sans interaction préalable avec la membrane plasmique est contradictoire avec l'absence d'internalisation du conjugué contrôle P12-R. En effet, si les conjugués Flavine et Lumichrome étaient endocytés sans interagir avec la membrane, le conjugué P12-R devrait également être internalisé de manière non spécifique par macropinocytose, lorsqu'il est présent dans le milieu d'incubation des cellules.

Il n'est pas exclu que l'internalisation des conjugués étudiés se produise également par la voie *caveolae* ou l'une des voies indépendantes de la clathrine et de la caveoline. Il est important de remarquer que la seule étude de colocalisation à l'aide de marqueurs fluorescents ne permet pas de déterminer avec certitude la ou les voies d'endocytose empruntées. Il est en effet fréquemment observé que de tels marqueurs sont internalisés par plusieurs voies dans certaines lignées cellulaires. Il serait donc indispensable, si l'on souhaitait conclure de manière certaine sur les voies empruntées par les conjugués Flavine ou Lumichrome, de combiner l'utilisation de marqueurs fluorescents avec l'usage d'inhibiteurs chimiques, la réalisation d'immunomarquage ainsi que l'inhibition par ARN interférence de protéines spécifiques de certaines voies d'endocytose. Seule la combinaison de toutes ces techniques ainsi que le recoupement des résultats permettraient de s'affranchir des problèmes de spécificité ou de toxicité de chacune de ces approches.

Les dérivés de la Riboflavine pour une internalisation ciblée des PNA?

La perspective de l'utilisation de dérivés de la Riboflavine pour permettre une vectorisation ciblée d'ON pose inévitablement la question du rôle d'un récepteur ou d'un transporteur spécifique de la Riboflavine lors de l'internalisation des conjugués. L'internalisation observée sur les cellules COS-1 (paragraphe 2.2 : article) permet *a priori* d'écarter une intervention nécessaire de la protéine de liaison à la RF ou RCP, puisque ces cellules ont été décrites pour ne pas l'exprimer (Mason et al., 2006). En ce qui concerne les récepteurs hRFT1, 2 et 3, aucune indication ne nous permet d'impliquer ou d'écarter un rôle de l'un de ces récepteurs. Pour ce faire, il serait judicieux d'étudier l'expression des trois gènes codant pour ces récepteurs dans les différentes lignées cellulaires étudiées par RT-PCR (en cours), puis d'inhiber l'expression de chacun d'entre eux par ARN interférence ou de les surexprimer pour observer un éventuel effet sur l'internalisation des conjugués.

L'échec à observer une compétition pour l'internalisation entre les conjugués F-P12-R et L-P12-R d'une part, et les ligands libres Riboflavine et Lumichrome d'autre part, est commun aux deux exemples précédents d'utilisation de la Riboflavine pour des approches de

vectorisation (Holladay et al., 1999) (Thomas et al., 2010). En effet, aucune inhibition de l'entrée de conjugués Riboflavine-BSA ni Riboflavine-PAMAM dendrimères n'est décrite dans ces études suite à l'ajout d'un excès de Riboflavine libre (x40 et x1000, respectivement) lors du traitement des cellules. En revanche, dans les deux cas, une inhibition est observée lorsque le compétiteur en excès correspond au conjugué Riboflavine-cargo lui-même.

Dans le cas du conjugué Riboflavine-BSA, les auteurs expliquent ces résultats en supposant que le conjugué interagirait bien avec un récepteur à la Riboflavine, mais que la taille importante du cargo (68 kDa) ralentirait fortement l'internalisation du conjugué. Ils avancent que la Riboflavine libre ajoutée en excès ne provoquerait alors pas de compétition vis-à-vis du conjugué car celle-ci serait internalisée beaucoup plus rapidement lors de sa fixation sur le même récepteur.

Dans le cas du conjugué Riboflavine-PAMAM dendrimères, les auteurs soulignent le fait que chaque conjugué possède six molécules de Riboflavine greffées et suggèrent qu'un même conjugué pourrait interagir avec plusieurs récepteurs à la Riboflavine. Ils avancent ainsi que l'absence de compétition serait le fait d'une avidité supérieure de l'interaction multivalente du conjugué par rapport à celle d'une interaction monovalente de la Riboflavine seule sur son récepteur.

Il est important de noter que seul un excès de 10 fois en ligand libre a pu être testé dans nos conditions expérimentales. Des concentrations supérieures en Riboflavine ou en Lumichrome, dont les solutions stocks sont préparées dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde), ne seraient en effet pas compatibles avec la viabilité cellulaire. L'utilisation de conjugués fluorescents à une concentration de l'ordre du micromolaire ne permet donc pas de reproduire les conditions d'excès en compétiteur d'un facteur 1000, fréquentes dans les études faisant usage de Riboflavine radiomarquée (Zempleni and Mock, 2000) (Huang and Swaan, 2001) (Huang et al., 2003). Il ne peut dès lors être exclu qu'une inhibition de l'internalisation des conjugués F-P12-R et L-P12-R pourrait être observée si l'excès de compétiteur était fortement augmenté. Des expériences supplémentaires, telle qu'une compétition avec un excès de conjugués non fluorescents F-P12 ou L-P12 (non synthétisés au cours du projet) pour l'internalisation de F-P12-R et L-P12-R, seraient également nécessaires pour préciser le mécanisme emprunté par les conjugués fluorescents.

Sortie des endosomes par PCI des conjugués Flavine ou Lumichrome - PNA - Rhodamine

Une observation inattendue d'un phénomène de PCI a été effectuée suite à l'irradiation au microscope de cellules ayant internalisé les conjugués F-P12-R et L-P12-R, puis F-P1-R et F-

P3-R. Un test de perméabilisation membranaire *in vitro* a permis de confirmer notre hypothèse de la Rhodamine comme responsable de ce phénomène, en démontrant que ce fluorochrome avait la capacité de perméabiliser des vésicules lipidiques suite à son irradiation.

Cette propriété peu décrite de la Rhodamine a été reportée il y a quelques mois (Gillmeister et al., 2011). Les auteurs de cette étude relatent en effet une relocalisation de la fluorescence émise par un conjugué GFP-TAT-Rhodamine, des endosomes vers le cytosol, suite à l'irradiation de cellules au microscope à fluorescence avec un filtre Rhodamine. Ils observent cet effet PCI sur plusieurs lignées cellulaires et concluent à une activité PCI médiée par la Rhodamine du fait de l'incapacité d'une irradiation avec le filtre GFP à déclencher ce phénomène.

Cette propriété de la Rhodamine pose évidemment la question de son utilisation, pourtant très répandue, dans les études de microscopie de fluorescence et requiert une prudence particulière dans l'interprétation des observations faites au microscope. Il est en outre probable que d'autres fluorophores, également capables de générer des espèces réactives de l'oxygène, puissent induire de la PCI.

Le test d'activité cellulaire des conjugués fluorescents F-13C-R et L-13C-R sur cellules HeLa perméabilisées à la SLO (paragraphe 2.4) a permis d'établir que le couplage à la Rhodamine est compatible avec l'activité antisens du PNA 13C.

Ce résultat est un argument au développement d'une stratégie consistant à coupler un ON à une molécule permettant l'internalisation de celui-ci, ici la Flavine ou le Lumichrome, ainsi qu'à une molécule permettant de provoquer la sortie du conjugué des endosomes, telle que la Rhodamine. L'avantage d'une telle approche serait de garantir à la fois une internalisation efficace de l'ON dans les cellules, tout en provoquant la sortie du conjugué des endosomes par irradiation, de manière ciblée. L'ON serait ainsi libre d'atteindre sa cible et d'accomplir son activité biologique, sous réserve qu'il ne soit pas dégradé par les espèces oxydantes lors de la photo-libération.

Quelques études ont été publiées concernant l'association de méthodes de vectorisation d'acides nucléiques (ADN plasmidique) avec des molécules induisant la PCI dans le but d'augmenter l'efficacité de la stratégie. On peut notamment citer le développement de complexes ternaires composés d'un ADN plasmidique associé à des lipides cationiques, le tout enveloppé dans un dendrimère de phtalocyanine (Nishiyama et al., 2005) ainsi que l'exemple d'un ADN plasmidique complexé avec un PAMAM dendrimère sur lequel ont été greffées des molécules de porphyrines (Shieh et al., 2008).

Le couplage d'un agent PCI à un ON vectorisé, ou toute autre molécule bioactive d'intérêt, aurait l'intérêt de diminuer le risque de toxicité induite par les approches classiques de PCI. Cette stratégie permettrait en effet de cibler les dommages photo-induits principalement aux membranes concernées, ce qui devrait résulter en une diminution de la toxicité non spécifique et permettre l'utilisation d'agents photosensibles moins puissants.

Effet de la nature et de la chimie des ON sur l'internalisation par les dérivés de la Riboflavine

Le fait que les conjugués fluorescents Flavine et Lumichrome 13T, 13C et P2 ne soient pas visualisés en fluorescence dans les cellules HeLa contraste fortement avec les résultats obtenus pour les conjugués P12, ou encore P1 et P3. Ces PNA ont une longueur de 12 ou 13 nucléotides, mais des séquences différentes (100% de bases pyrimidiques pour 13T et 13C, ou 50, 61, 58 et 33% pour les PNA P12, P1, P2 et P3, respectivement).

Ces résultats sont difficiles à expliquer, si ce n'est par la formation d'une éventuelle structure au sein de certaines séquences de PNA ou encore d'agrégats non dissociés par les chauffages précédant l'incubation (voir Matériel et Méthodes), et qui empêcheraient la Flavine et le Lumichrome d'interagir à la membrane des cellules. Dans le cas des conjugués 13C et 13T, une hypothétique structure secondaire ou agrégation de ceux-ci serait au moins partiellement déstabilisée ou rompue en présence de la cible du PNA, puisque que les expériences de retard sur gel ainsi que l'activité de blocage stérique observée en cellules perméabilisées (chapitre I) démontrent la fixation efficace de ces PNA sur leur cible ARN. La réalisation d'expériences de spectroscopie (absorption, fluorescence, dichroïsme circulaire) avec les différentes séquences de PNA devrait permettre de mettre en évidence la présence de structures.

Les différences de profil observées pour les conjugués F-P12R d'une part (vésiculaire, paragraphe 2.2), et F-P1-R et F-P3-R d'autre part (vésiculaire et diffus, paragraphe 2.3) confirment l'importance de la séquence du PNA dans cette stratégie de vectorisation. Ces trois conjugués, de chimie et de longueur similaires, ne diffèrent en effet que par la nature de leur séquence. Il serait toutefois nécessaire d'étudier un plus grand nombre de conjugués pour établir une éventuelle règle de choix de séquences optimales.

Concernant les ON de chimie LNA, les conjugués F-18L-R et L-18L-R n'ont pas été observés en fluorescence dans les cellules HeLa. Il est cependant trop tôt pour conclure sur l'incapacité des dérivés de Riboflavine à induire une entrée en cellules des ON de type LNA-ADN, au regard du caractère séquence-dépendant de l'internalisation des conjugués PNA. Il

serait donc judicieux de tester des conjugués LNA de séquences différentes, telles que celles de P12, P1 ou P3, avant d'écartier définitivement la possibilité de vectoriser des ON LNA, ou d'autres oligonucléotides chargés, par la Flavine ou le Lumichrome.

2.6 Conclusions

Les expériences d'internalisation cellulaire de conjugués fluorescents F-PNA-R et L-PNA-R, analysées par microscopie de fluorescence et cytométrie en flux, ont permis de démontrer que la Flavine et le Lumichrome pouvaient induire l'entrée d'un PNA dans les différentes lignées cellulaires HeLa, RPE1, Caco2 et COS-1. Cette internalisation passerait notamment par une voie d'endocytose nommée macropinocytose. Le mécanisme d'entrée des conjugués différencierait cependant de celui de la Riboflavine et du Lumichrome libres.

Le profil de fluorescence observé dans les cellules incubées avec les conjugués F-PNA-R et L-PNA-R est principalement vésiculaire, à des temps précoces comme tardifs, et témoigne d'une séquestration des conjugués dans les endosomes puis les lysosomes. La rupture des endosomes peut être provoquée par un effet PCI de la Rhodamine, suite à l'irradiation des cellules à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome. Par ailleurs, le couplage de conjugués Flavine ou Lumichrome - PNA à la Rhodamine n'affecte pas l'inhibition de la traduction induite par ces conjugués mesurée après perméabilisation des cellules.

L'internalisation de PNA par la Flavine et le Lumichrome apparaît cependant dépendante de la séquence de l'ON puisque sur six PNA différents testés, trois sont internalisés dans ces cellules lorsqu'ils sont couplés à la Flavine et à la Rhodamine.

En résumé, ces résultats ont permis de démontrer que la double conjugaison d'un PNA à la Flavine ou au Lumichrome d'une part, et à la Rhodamine d'autre part, permet de provoquer son internalisation en cellule, puis sa libération dans le cytosol et le noyau par PCI.

Conclusion générale et Perspectives

1. Résumé des résultats

Le but de ce projet était d'étudier le potentiel de dérivés de la Riboflavine, ou vitamine B2, pour internaliser des oligonucléotides antisens en cellules, avec un potentiel ciblant.

A l'issue des expériences menées au cours de ce travail de thèse, il est désormais démontré que la Flavine et le Lumichrome peuvent induire l'entrée de PNA dans diverses lignées cellulaires, par endocytose. Ceci confirme le rôle du noyau isoalloxazine, plutôt que la chaîne ribityle, pour l'internalisation de la Riboflavine (Monaco, 1997) (Yamamoto et al., 2009).

La séquestration endosomale faisant suite à l'internalisation des conjugués Flavine et Lumichrome - PNA - Rhodamine a été contournée par la photo-libération des conjugués induite par la Rhodamine, provoquant une relocalisation de ceux-ci de structures vésiculaires vers le cytosol et le noyau des cellules. Il a en outre été montré que cette double conjugaison permet de maintenir l'activité antisens des ON quand ceux-ci sont introduits dans les cellules par perméabilisation.

Ces résultats permettent donc de proposer une nouvelle construction trifonctionnelle pour l'internalisation et la libération dans la cellule de molécules bioactives. Les conjugués développés au cours de ce projet sont en effet composés de trois entités à fonction distincte : une molécule à activité biologique potentielle : le PNA, un agent de vectorisation : le dérivé de la Riboflavine, et un agent PCI : la Rhodamine.

En outre, un effet de la séquence du PNA a été observé pour l'efficacité de l'internalisation et reste à élucider. Ainsi, deux ON bloqueurs stériques ciblant la séquence PPT avaient été sélectionnés pour leur efficacité d'inhibition de la traduction, dans le but de tester leur activité en pénétration libre après couplage à la Flavine ou au Lumichrome, sans succès.

L'explication à cet échec a été fournie par les études d'internalisation des conjugués fluorescents correspondants, qui ont révélé une incapacité à pénétrer dans les cellules. Ces résultats reposent donc sur des données de fluorescence et nous n'avons à ce jour pas pu obtenir de données d'activité de ces conjugués.

2. Perspectives

Ce travail de thèse a permis d'identifier une construction photo-activable pour l'internalisation de molécules bioactives. De nombreuses questions restent cependant en suspens, ainsi que des pistes à explorer.

Mise en évidence d'une activité biologique

Un point crucial dans le développement ultérieur de cette stratégie sera l'activité biologique cellulaire des conjugués Flavine ou Lumichrome - PNA - Rhodamine, en pénétration libre et après PCI. La détection d'une telle activité sera en effet la seule garantie qu'une quantité suffisante de PNA est internalisée puis libérée des endosomes pour exercer son activité biologique, et que celui-ci n'est donc pas dégradé lors de la photo-libération. Il est toutefois important de garder à l'esprit que le profil observé en microscopie avec un conjugué fluorescent ne corrèle pas toujours avec son activité biologique (Lu et al., 2009). Il est donc possible que le marquage cellulaire diffus observé après PCI au microscope ne se traduise pas dans les faits par une activité biologique des conjugués internalisés ou à l'inverse, qu'une activité soit observée malgré l'absence de signal fluorescent.

Pour cette étude d'activité des conjugués Flavine et Lumichrome, de nouvelles séquences d'ON ciblant la région 5'UTR de l'ARNm Luciférase des cellules HeLa 1002 pourraient être choisies dans un premier temps, l'intérêt principal de ce système rapporteur disponible résidant dans la rapidité et la facilité avec lesquelles la lecture du résultat peut être effectuée. Le choix de ces séquences pourrait s'orienter encore une fois vers des ON courts, ceux-ci ayant récemment démontré une efficacité élevée associée à une bonne spécificité. On peut citer dans ce sens l'exemple d'ON LNA 8mer ciblant des micro ARN (Obad et al., 2011). Parmi les

séquences choisies, des conjugués qui sont à la fois internalisés dans les cellules HeLa et doués d'une activité cellulaire de blocage stérique élevée devront être identifiés pour mener à bien un test d'activité dans ce système expérimental.

Malgré les avantages pratiques de notre système rapporteur, il est à noter que sa faible sensibilité constitue un inconvénient, en particulier pour détecter une activité en pénétration libre de conjugués PNA. L'utilisation d'un système rapporteur où l'activité d'un ON se traduit par l'apparition d'un signal, et non une inhibition, permettrait de se placer à un niveau de sensibilité bien plus élevé et ainsi de détecter des activités même assez faibles.

Un des systèmes rapporteurs de ce type correspond à la lignée HeLa pLuc 705 développée par R. Kole qui permet de détecter l'activité de correction d'épissage d'ON dirigés contre l'exon 2 muté du pré-ARNm de la β -globine, résultant en la synthèse d'une protéine Luciférase fonctionnelle (Guterstam et al., 2008). Quelque soit le système rapporteur choisi, si l'étude d'activité des conjugués Flavine et Lumichrome sur un système rapporteur est concluante, il sera nécessaire de réaliser par la suite un test d'activité dans un contexte biologique pertinent et d'intérêt thérapeutique, en cellules et *in vivo*.

Les dérivés de la Riboflavine pour une vectorisation ciblée?

La poursuite de l'étude du mécanisme d'entrée cellulaire des conjugués paraît indispensable pour évaluer le caractère ciblant de cette stratégie. Il sera particulièrement intéressant de rechercher l'implication d'un récepteur ou d'un transporteur spécifiques dans l'internalisation des conjugués, afin d'identifier les lignées cellulaires qui peuvent être ciblées, et de choisir ainsi les systèmes biologiques les plus pertinents pour évaluer cette approche.

Vers de nouveaux conjugués trifonctionnels

Si l'incapacité de la Flavine à provoquer des dommages oxydatifs sur un ARNm cible lorsqu'elle est conjuguée à un ON se confirme, il ne présentera que peu d'intérêt de poursuivre l'étude sur la Flavine et Lumichrome en parallèle. Dans le cas contraire, il serait judicieux de destiner le Lumichrome à la vectorisation d'ON modulateurs d'épissage, qui ne doivent pas dégrader leur cible pré-ARNm, et de destiner la Flavine à la vectorisation d'ON à activité antisens classique, où la dégradation de la cible ARNm permettrait d'augmenter leur efficacité.

En outre, il pourrait être envisagé de synthétiser des conjugués multivalents pour augmenter l'efficacité de la vectorisation, sur le modèle par exemple des conjugués trivalents et

tétravalents de peptides RGD cycliques couplé à un siARN, développés par Juliano (Alam et al., 2011).

A plus long terme, et si les conditions évoquées précédemment sont remplies, d'autres types d'ON ou de molécules antisens, tels que les siARN, pourraient être couplés à des dérivés de la Riboflavine. Par ailleurs, l'utilisation de ces dérivés pour l'adressage de petites molécules thérapeutiques ou d'agents d'imagerie pourrait également être envisagée, en particulier si un ciblage est possible.

L'utilisation d'agents PCI différents de la Rhodamine au sein des conjugués pourrait également être considérée. Il sera notamment intéressant de comparer des agents PCI d'efficacité différente (forte vs faible) pour identifier la molécule photosensible dont la balance efficacité/toxicité est optimale, dans le cadre de notre approche où l'agent PCI est conjugué à la molécule internalisée.

Enfin, nous pouvons souhaiter que l'étude des mécanismes cellulaires de l'endocytose et de la voie endolysosomale permettra à l'avenir d'identifier les paramètres essentiels à une vectorisation efficace, et ainsi de développer les approches nécessaires pour donner toute leur place aux stratégies antisens et oligonucléotides en général, dans des applications thérapeutiques.

Matériels & Méthodes

Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés (Phosphorothioate, LNA et PNA) ont été synthétisés par Eurogentec et leurs séquences sont regroupées dans le tableau suivant :

Chimie de l'ON	Nom	Séquence (5' -> 3' ou N -> C)	Longueur
PNA	13C	TCCCCCTTTTCT	13mer
	13T	CCCCTTTTCTTTT	13mer
	PNA ctrl	TTTTCTCTCCCT	13mer
	18P	TCCCCCTTTTCTTTTAA	18mer
	P12	TCTGACGATTAG	12mer
	P1	GTCTCCATGGTG	13mer
	P2	GGCTTTACCAAC	12mer
	P3	GGAATGCCAAGC	12mer
LNA-ADN mixmer	18L	TcCcCcCtTtTcTtTtaa	18mer
	LNA ctrl	aAaTtTaGgGaTaAcAgg	18mer
LNA-ADN gapmer	18LD	tcccCCTTTTCTtttaa	18mer
	LD ctrl	aaattTAGGGATAacagg	18mer
Phosphorothioate	18PS	TCCCCCTTTTCTTTTAA	18mer

Table 1 : Séquences et chimies des différents ON utilisés au cours du projet
 Dans le cas des LNA-ADN, en majuscule : nucléotide ADN, en minuscule : nucléotide LNA

Conjugués Flavine/Lumichrome - ON et Flavine/Lumichrome - ON - Rhodamine

Les synthèses de tous les conjugués Flavine/Lumichrome - ON et double-conjugués Flavine/Lumichrome - ON - Rhodamine ont été effectuées par le Dr Philippe Simon, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Marc Fontecave.

Radiomarquage de l'ARN cible PPT 19mer en position 5'

20pmol d'ARN cible PPT 19mer de séquence 5' TTAAAAGAAAAGGGGGGAT 3' sont radiomarqués par 10 unités de T4 Polynucléotide Kinase (New England Biolabs) dans un tampon Kinase 1X en présence de 10pmol de γ^{32} -P-ATP, pendant 30 minutes à 37°C. La réaction enzymatique engendre le transfert du groupement phosphate radiomarqué en position γ sur l'extrémité 5' OH de la cible. L'enzyme, le tampon ainsi que le γ^{32} -P-ATP non incorporé sont ensuite éliminés par passage du milieu réactionnel sur une mini colonne d'exclusion Biospin 6 (Biorad).

Gels retard

Afin de réduire les structures formées par l'ARN cible 19 mer, celui-ci est chauffé 10 minutes à 90°C puis placé immédiatement dans la glace. 3nM de cible radiomarquée sont alors incubés avec diverses concentrations d'oligonucléotides dans un tampon Tris 50mM pH 7,2 avec 15% de sucrose, pendant 1 heure à 20°C. Les produits de l'incubation sont ensuite déposés sur un gel natif acrylamide/bis-acrylamide (19:1) à 15% final dans un tampon TBE 1X, et la migration de ces produits est réalisée à 4 Watts dans une cuve en plexiglas thermostatée à 20°C. Le gel est ensuite séché, exposé dans une cassette disposant d'un écran radiosensible puis révélé à l'aide d'un scanner Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Digestion par la RNase H

10nM de cible radiomarquée, préalablement chauffée à 90°C pendant 10min et placée dans la glace, sont incubés avec 400nM d'oligonucléotides dans un tampon RNase H 1X (75mM KCl, 3mM MgCl₂ et 50mM Tris HCl pH 8,3) pendant 1 heure à température ambiante. 0,06 unités de RNase H d'*Escherichia coli* (New England Biolabs) sont ensuite ajoutées à l'échantillon et la digestion se déroule toute la nuit à 37°C. Afin d'éliminer la RNase H et le tampon, les produits sont précipités à l'Ethanol puis resuspendus dans du formamide pur (Sigma). Après chauffage pendant 2 minutes à 90°C, les échantillons sont déposés sur un gel dénaturant acrylamide/bis-acrylamide (19:1) à 15% final préparé avec de l'urée à 7M dans un tampon TBE 1X. La migration se déroule à 70 Watts.

Culture cellulaire

Les cellules HeLa 1002 dérivent de cellules HeLa/Tet-on (Clontech) qui expriment de manière stable la protéine rTet nécessaire à l'activation des promoteurs inductibles à la Doxycycline. Ces cellules ont intégré stablement le plasmide pCMV(+)PPT/luc contenant le gène de la Luciférase de *Photinus pyralis* sous le contrôle d'un promoteur CMV inductible à la Doxycycline (pour plus de détails voir (Brunet et al., 2005)). Ce plasmide porte également un insert de 55 paires de bases contenant la séquence cible PPT 5' AAAAGAAAAGGGGGGA 3' qui a été clonée dans la région transcrite mais non traduite en 5' du gène Luc (5'UTR). Les cellules HeLa 1002 possèdent donc de manière stable la séquence PPT en amont d'un gène rapporteur Luciférase sous le contrôle d'un promoteur inductible à la Doxycycline.

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO₂. Les milieux de culture (Gibco) utilisés pour cultiver les différentes lignées cellulaires sont les suivants :

- HeLa 1002 : DMEM supplémenté par 7% de sérum de veau foetal (SVF)
- RPE1 : DMEM/F12 + 10% SVF
- Caco2 : MEM + 20% SVF
- COS-1 : DMEM + 10% SVF

Tous les deux jours environ, les cellules sont lavées au PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺, Gibco) puis trypsinées (Gibco). Après une quinzaine de passages, les cellules sont sacrifiées et une nouvelle ampoule est décongelée.

Perméabilisation des cellules à la Streptolysine O (SLO)

La SLO est une toxine bactérienne qui perméabilise de manière réversible la membrane des cellules. L'intérêt de cette méthode réside dans la possibilité de faire entrer efficacement tous types d'oligonucléotides dans des cellules en culture et notamment les PNA, dont la charge neutre ne permet pas la transfection par les lipides cationiques. Le protocole utilisé pour la perméabilisation des cellules HeLa 1002 est dérivé d'un protocole décrit précédemment (Walev et al., 2001).

Les cellules sont trypsinées, lavées deux fois à l'HBSS -Ca²⁺/Mg²⁺ (Gibco) puis comptées avec une lame de Mallasez afin de les resuspendre à une concentration de 13 millions de cellules/ml dans de l'HBSS. 20µl de cette solution (soit 260 000 cellules) sont déposés au fond d'un puits d'une plaque 96 puits et les cellules reçoivent le volume d'oligonucléotides

correspondant à la concentration souhaitée. Un volume optimisé de SLO (fournie par S. Bakhdi de l'Université Johannes Gutenberg, Allemagne) à 20ng/μl est ajouté aux cellules et la plaque est alors placée à 37°C pendant 15 minutes. A l'issue de ces 15 minutes, la perméabilisation est arrêtée par l'ajout de 180μl de DMEM (contenant 1,8 mM de CaCl₂) + 7% SVF et les cellules sont placées à 37°C pendant 30 minutes.

Les cellules sont ensuiteensemencées en triplicate dans une plaque 96 puits à raison de 40 000 cellules par puits, pour le dosage ultérieur de l'activité Luciférase. En outre, 100 000 cellules sontensemencées dans un puits de plaque 48 puits pour le dosage des ARNm Luc par RT-PCR quantitative. Une heure après l'ensemencement, les cellules sont induites avec une concentration finale de 1μg/ml de Doxycycline (Sigma).

Mesure de l'activité Luciférase Photinus pyralis

24 heures après leur perméabilisation, les cellules sont rincées au PBS puis lysées avec 60μl par puits de Passive Lysis Buffer (Promega) pendant 30 minutes sous agitation. A l'issue des 30 minutes, 25μl de lysat par point sont placés dans une plaque 96 puits blanche en polystyrène (Corning). La Luminescence de la Luciférase est alors déterminée avec le Luciférase Assay System (Promega) sur un luminomètre Victor² (Wallac). Les données de Luminescence obtenues sont ensuite normalisées par microgramme de protéines suite au dosage des protéines par le Bradford Protein Assay (Biorad).

Dosage des ARNm Luciférase par RT-PCR quantitative (RT-qPCR)

24 heures après la perméabilisation, les cellules sont trypsinées et culottées à 3000 rpm pendant 5min à 4°C. Après un rinçage au PBS, les cellules sont à nouveau culottées et le surnageant aspiré. L'extraction d'ARN est alors réalisée avec l'Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene) selon les instructions du fabricant. Les ARN sont ensuite rétro-transcrits avec la reverse-transcriptase SuperScript II (Invitrogen), toujours selon les instructions du fabricant. La qPCR sur les ADNc synthétisés est effectuée avec le Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix with Rox (Stratagene) sur un appareil MX3000P (Stratagene).

Les primers Luc (Eurogentec) sont utilisés à 400nM et leur séquence est la suivante : forward 5' GAAGAGATACGCCCTGGTTC 3' et reverse 5' GGCTGCGAAATGCCCATACT 3'. Deux gènes de ménages, GAPDH et GUSB, sont utilisés comme contrôles pour normaliser les données Luc. Les primers GAPDH et GUSB sont commercialisés par QIAGEN (QT01192646 et QT00046046, respectivement) et utilisés à la concentration recommandée par le fabricant. Les

données de la RT-qPCR sont ensuite analysées d'après l'équation de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Test d'activité en pénétration libre

Le protocole suivant a fait l'objet de nombreuses variations mais ce sont les conditions les plus couramment utilisées qui sont décrites ici. 4000 cellules HeLa 1002 sont ensemencées par puits de plaque 96 puits dans 100µl de DMEM + 7% SVF. Le lendemain, les stocks de conjugués sont chauffés 5 minutes à 65°C. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont traitées par 50µl d'une solution de conjugués à la concentration souhaitée dans de l'OptiMEM (Gibco) pendant 4h à 37°C. A l'issue du traitement, les cellules sont induites par l'ajout de 150µl de DMEM (7% SVF final) contenant 1µg/ml de Doxycycline dans chaque puits. Les cellules sont alors incubées à 37°C pendant 24h ou 40h avant d'être lysées pour quantification de l'activité Luciférase, comme indiqué dans le chapitre précédent.

Chauffage des stocks de conjugués fluorescents pour les expériences en cellules

Les conjugués PNA fluorescents étant peu solubles, ceux-ci sont systématiquement chauffés avant leur utilisation pour les expériences en cellules pendant 5min à 85°C (Janowski et al., 2006). Une fois dilués dans l'OptiMEM à la concentration souhaitée, les solutions de conjugués sont à nouveau chauffées 5min à 80°C, de manière à s'assurer de l'élimination des agrégats. Lorsque la solution de conjugués/OptiMEM est revenue à température ambiante, une autre molécule est éventuellement ajoutée à cette solution pour le traitement des cellules (azoture de sodium, marqueur de voie d'endocytose, agent lysosomotropique...).

Etude de l'internalisation de conjugués fluorescents

30 000 cellules HeLa, 15 000 cellules RPE1, 40 000 cellules Caco2 ou COS-1 sont ensemencées par puits de lame Ibidi 8 puits (Biovalley) dans 200µl de leur milieu de culture. Le lendemain, des solutions de conjugués fluorescents sont préparées dans de l'OptiMEM, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont traitées par cette solution pendant 1h à 3h à 37°C. A l'issue du temps de traitement, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées au PBS. Pour une analyse ultérieure (24h post-traitement), les cellules sont replacées à l'étuve dans du milieu de culture frais. Pour une analyse immédiate, les cellules sont observées dans 200µl d'HBSS avec un microscope à fluorescence Leica DMIRE2 équipé d'un filtre Rhodamine (excitation : 530-560nm, émission : 575-645nm) et les acquisitions de séries de plans en z sont réalisées avec le

logiciel Metamorph. Pour les cellules Hela, une stack d'images est composée classiquement de 36 plans distants de 0.2µm en z, à 30ms de temps d'exposition en moyenne.

Pour une quantification du signal au cytomètre en flux, les cellules sont trypsinées, rincées au PBS et resuspendues dans 200µl d'HBSS pour être analysées avec un cytomètre C6 (Accuri) et le logiciel C Flow Plus. L'étape de traitement à la trypsine et les rinçages au PBS doivent permettre d'éliminer la fraction de conjugués fluorescents liés à la membrane des cellules, et non internalisés.

Inhibition de l'endocytose par déplétion en ATP ou traitement à 4°C

30 000 cellules HeLaensemencées en lame Ibidi sont traitées par une solution à 1.5µM de conjugué F-P12-R, L-P12-R ou P12-R préparée dans de l'OptiMEM. Les cellules sont alors soit placées 1h à 4°C, soit traitées par 10mM d'azoture de sodium (Acros Organics) et 6mM de 2-déoxy-D-Glucose (Sigma) pendant 1h à 37°C. A l'issue du traitement, les cellules sont analysées immédiatement au microscope ou au cytomètre.

Compétition avec des dérivés de la Riboflavine

30 000 cellules HeLaensemencées en lame Ibidi sont traitées par une solution à 1.5µM de conjugués F-P12-R ou L-P12-R supplémentée par 15µM de Riboflavine ou Lumichrome préparée dans de l'OptiMEM, pendant 1h à 37°C. A l'issue du traitement, les cellules sont analysées immédiatement au cytomètre.

Etudes de colocalisation avec des marqueurs de voies d'internalisation

Les différents marqueurs fluorescents utilisés proviennent d'Invitrogen et sont :

- Transferrine - Alexa Fluor 488 (A488), marqueur de l'endocytose médiée par la clathrine et utilisée à 25µg/ml
- Dextran - A488, marqueur de la macropinocytose et utilisé à 0.25mg/ml
- LysoTracker Green DND-26, marqueur des lysosomes et utilisé à 1µM

30 000 cellules HeLaensemencées en lame Ibidi sont traitées par une solution à 1.5µM de conjugué F-P12-R ou L-P12-R préparée dans de l'OptiMEM, à laquelle est ajouté le marqueur fluorescent à la concentration donnée, pendant 2h à 37°C. Les études de colocalisation avec le LysoTracker se font à des temps longs. Les cellules sont incubées pendant 2h avec 1µM de

LysoTracker Green DND-26 dans de l'OptiMEM, et ce, 19h après la fin du traitement par les conjugués fluorescents F-P12-R ou L-P12-R.

A l'issue du traitement, les cellules sont analysées immédiatement au microscope avec les filtres Rhodamine et FITC (excitation : 460-500nm, émission : 512-542nm).

Traitement par des agents lysosomotropiques

Les trois agents lysosomotropiques utilisés proviennent de Sigma et sont les suivants :

- Chloroquine, utilisée à 100 μ M
- Monensine, utilisée à 25 μ M
- Primaquine, utilisée à 1.5 μ M

30 000 cellules HeLaensemencées en lame Ibidi sont traitées par une solution de conjugués fluorescents à 1.5 μ M dans de l'OptiMEM pendant 3h à 37°C. A l'issue du traitement, les cellules sont replacées à l'étuve dans du milieu de culture frais pendant 21h. Suite à cette incubation, les cellules sont traitées par une solution d'agent lysosomotropique à la concentration donnée préparée dans de l'OptiMEM, pendant 4h à 37°C. A l'issue du traitement, les cellules sont analysées immédiatement au microscope.

Acquisition de vidéo en time-lapse (PCI)

Les vidéos en time-lapse illustrant l'effet PCI observé au microscope ont été réalisées sur des cellules HeLa au point 24h post-traitement par 1.5 μ M de F-P12-R ou L-P12-R pendant 3h. Les cellules sont irradiées continuellement au microscope à travers le filtre Rhodamine (excitation : 530-560nm, émission : 575-645nm) avec acquisition d'une image toutes les 10 secondes. La vidéo est ensuite montée avec Image J.

Préparation de petites vésicules uni-lamellaires (SUV) et test de dégradation membranaire in vitro par la Rhodamine

Afin de tester le potentiel de la Rhodamine à produire un effet PCI et donc à dégrader des lipides membranaires suite à son irradiation, de petites vésicules lipidiques uni-lamellaires (SUV) ont été préparées, d'après la méthode décrite d'extrusion de vésicules multi-lamellaires à travers un filtre de polycarbonate (Kuzelova and Brault, 1994) (Mayer et al., 1986) (Olson et al., 1979).

Le Dioleoyl-sn-phosphatidylcholine (DOPC) ou le L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rho-Lip), provenant tous deux d'Avanti Polar Lipids, ont été utilisés pour préparer des SUV. Tout d'abord, une solution de DOPC ou un mélange DOPC/Rho-Lip (ratio 100/1) dans du chloroforme sont asséchés et le film lipidique obtenu est réhydraté dans 20mM de PBS pH 7.4 contenant 50mM de carboxyfluorescéine (CF, Sigma Aldrich). La suspension de liposomes est ensuite extrudée dix fois à travers une membrane de polycarbonate dont les pores ont un diamètre de 100 nm (Poretics). A l'issue de ces dix extrusions, le diamètre des vésicules est estimé à 135 ± 30 nm (Mojzisova et al., 2009). Les SUV sont enfin séparées de la CF non encapsulée par filtration sur gel de Sepharose (GE Healthcare Bio-Science).

Des solutions contenant 0.5mM de SUV (DOPC ou DOPC/Rho-Lip) sont préparées dans du PBS et irradiées avec un arc au Xenon de 150W monté sur une lampe équipée d'un réflecteur. La longueur d'onde d'irradiation est sélectionnée par l'intermédiaire du filtre rouge Leica utilisé pour les expériences de PCI sur cellules. Immédiatement après l'irradiation de l'échantillon pendant 10 minutes, la cinétique de relargage de la CF, synonyme d'une augmentation de fluorescence, est mesurée avec un spectrofluorimètre Aminco Bowman Series 2 (Edison). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la CF sont de 490nm et 520nm, respectivement. Une fois la cinétique mesurée, du Triton X-100 (Sigma Aldrich) est ajouté à l'échantillon pour induire la rupture totale des vésicules. Les intensités de fluorescence correspondant à un relargage total de la CF ont été utilisées pour la normalisation des données.

Spectroscopie d'absorption

L'acquisition des spectres d'absorption de la Flavine, du Lumichrome et de la Rhodamine a été effectuée à température ambiante, sur un spectrophotomètre Uvikon 940 (Kontron), à une concentration d'environ 100 μ M pour la Flavine et le Lumichrome et 10 μ M pour la Rhodamine. Les expériences ont été réalisées dans 10mM de cacodylate pH 7.2 (LiOH) et 100mM de NaCl, dans des cuves en quartz de chemin optique de 1cm.

Projet annexe

Etude de la corrélation entre la fréquence de translocation et la proximité nucléaire des loci de cassures double-brin d'ADN

L'opportunité m'a été donnée, au cours de ma thèse, de participer à un projet sur une thématique éloignée de mon projet principal, pour lequel j'ai pu mettre à profit mes compétences en microscopie de fluorescence.

1. Introduction et présentation du projet

Les translocations chromosomiques consistent en la fusion de deux chromosomes ou plus, et sont caractéristiques de nombreux cancers. Il a été démontré qu'elles résultent de deux cassures double-brin (CDB) simultanées sur deux chromosomes hétérologues, et que la jonction entre les chromosomes transloqués est le fruit d'une réparation par Non-Homologous-End-Joining (NHEJ) (Richardson and Jasin, 2000) (Weinstock et al., 2006).

Des centaines de translocations ont été identifiées à ce jour comme marqueurs génétiques dans différents types de leucémies, lymphomes, sarcomes et carcinomes de la prostate et du poumon notamment (Rowley, 2008). Ces translocations conduisent le plus souvent à la production d'une nouvelle protéine de fusion ou à la surexpression d'un oncogène préexistant (proto-oncogène).

Le sarcome d'Ewing est associé à plusieurs translocations qui forment une protéine de fusion entre le domaine d'activation transcriptionnelle du gène Ewing (*EWS*) et l'un des 5 gènes de la famille des facteurs de transcription ETS (*FL1*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4* et *FEV*) comprenant un domaine de liaison à l'ADN. 85% des sarcomes d'Ewing présentent la translocation caractéristique t(11;22)(q24;q12) qui génère le gène de fusion *EWS-FLI1* dont le produit agit comme un facteur de transcription aberrant (Toomey et al., 2010).

L'implication des translocations dans de nombreux cancers nécessite d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de la formation des translocations. Il semble intéressant notamment de comprendre pourquoi une translocation se produit préférentiellement entre deux loci, comme c'est le cas dans le sarcome d'Ewing. Dans la mesure où deux chromosomes hétérologues portant une CDB doivent être en contact physique pour être transloqués entre eux, on peut supposer que l'échange se fait d'autant plus efficacement que les CDB sont spatialement proches dans le noyau. Cette hypothèse, baptisée "contact-first model", suggère que la proximité physique des loci au moment de la survenue des CDB serait un facteur déterminant dans le choix de leur partenaire de translocation (Soutoglou and Misteli, 2008) (Figure 1.1). Ce modèle postulant que la proximité spatiale influence la nature des translocations formées s'oppose toutefois à une seconde hypothèse, nommée "breakage-first model". Ce second modèle stipule que les extrémités cassées des chromosomes pourraient diffuser sur de longues distances dans le noyau à la recherche d'un partenaire de translocation approprié (Soutoglou and Misteli, 2008) (Figure 1.1).

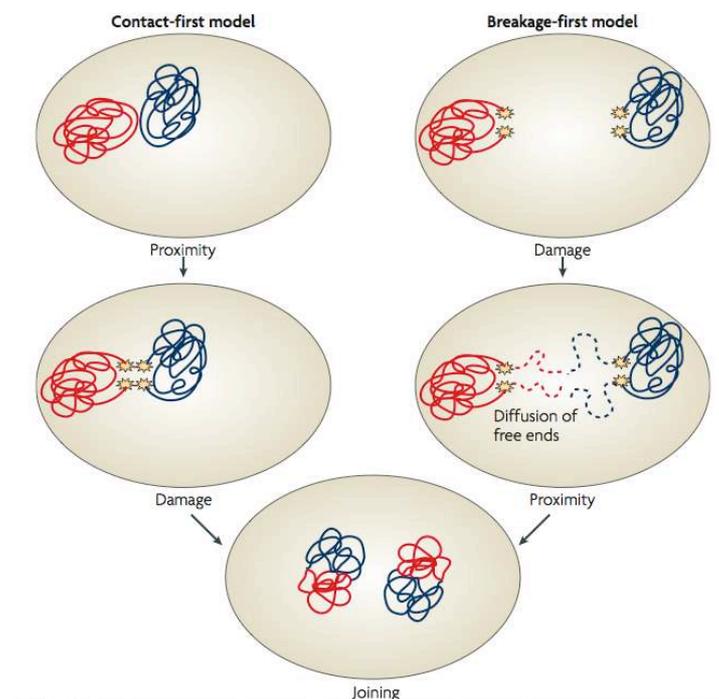


Figure 1.1 : Les deux modèles de formation des translocations (Misteli and Soutoglou, 2009)

La formation d'une translocation requiert un échange entre les extrémités de deux chromosomes hétérologues et implique que les extrémités soient en contact. Cette interaction physique peut se produire avant l'événement de CDB (« contact first » model) ou suite au déplacement par diffusion des extrémités cassées au sein du noyau, après la survenue des CDB (« breakage first » model)

Dans la mesure où les territoires chromosomiques et la position des gènes au sein de ces territoires varient selon le type cellulaire, le modèle "contact-first" pourrait expliquer pourquoi la nature et la fréquence des translocations formées varient selon les tissus (Soutoglou and Misteli, 2008). Cette hypothèse est également en accord avec la démonstration que la proximité spatiale de *MYC* avec ses partenaires de translocation les plus fréquents dans le cadre du lymphome de Burkitt (*IGH*, *IGK* et *IGL*) est corrélée avec les fréquences de translocations observées chez les patients (Roix et al., 2003). De même, il a été établi plus récemment que le traitement aux androgènes d'une lignée de cancer de la prostate induisait la proximité nucléaire des gènes *TMPRSS2* et *ERG* et augmentait l'apparition de la translocation entre ces deux loci lorsque les cellules sont irradiées pour générer des CDB (Mani et al., 2009) (Lin et al., 2009).

Cependant, la majorité des études visant à étudier le mécanisme d'apparition des translocations sont menées rétrospectivement. La mesure des distances est en effet souvent réalisée sur des cellules "normales" où il n'a pas été prouvé que les translocations pouvaient réellement se produire, ou encore sur une population hétérogène où la sous-population pouvant former la translocation est difficile à identifier. Enfin, de nombreuses études ne prennent pas en compte le fait que la susceptibilité des séquences ADN à former des CDB varie selon les loci (Soutoglou and Misteli, 2008). Dès lors, les études directes pour investiguer une corrélation entre la fréquence de translocation et la distance nucléaire des loci impliqués peuvent être fortement biaisées.

J'ai eu l'occasion de prendre part à une étude où nous nous sommes proposés de répondre à la question suivante : existe-t-il une corrélation directe entre la fréquence de formation de translocations et la proximité spatiale des loci où se passent les CDB initiales?

Le projet mis en oeuvre pour répondre à cette question consiste à induire de manière ciblée des CDB sur différents loci chromosomiques puis à quantifier la fréquence des translocations qui en résultent. En parallèle, les distances nucléaires entre ces différents loci est aussi calculée.

Les cellules utilisées dans le cadre de cette étude sont des cellules humaines sans réarrangements génomiques majeurs, comme les cellules pluripotentes mésenchymateuses dérivées de cellules souches embryonnaires humaines (cellules MES). Ces cellules présentent plusieurs avantages : elles sont supposées être les cellules précurseurs du sarcome d'Ewing (Toomey et al., 2010), cancer caractérisé par une translocation entre les chromosomes 11 et 22 et elles peuvent se différencier en différentes lignées (myoblastes, chondrocytes, ostéocytes

et adipocytes) pour lesquelles il serait intéressant d'étudier la localisation des loci où les CDB sont induites.

En pratique, les CDB sont induites par des nucléases artificielles à doigts de Zinc (ou ZFN pour Zinc Finger Nucleases) (Urnov et al., 2005) sur les chromosomes 11, 19 et 22. Les ZFN sont composées d'un domaine de liaison à l'ADN, formé par plusieurs motifs à doigt de Zinc, et d'un domaine nucléase Fok-1 qui peut induire une CDB sur l'ADN suite à la dimérisation des ZFN (Figure 1.2).

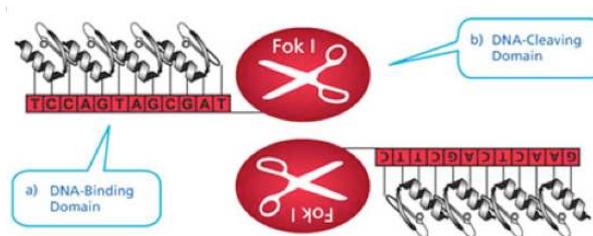


Figure 1.2 : Structure d'une ZFN ou nucléase à doigt de Zinc (sigmaaldrich.com)

Une ZFN est composée d'un domaine de liaison à l'ADN couplé à un domaine nucléase non spécifique Fok 1. C'est la dimérisation de deux ZFN au niveau de la séquence cible qui provoque l'induction d'une CDB ciblée.

Il a été démontré par le Dr E. Brunet que l'induction de deux CDB par des ZFN dans les cellules MES conduisait à la formation de translocations entre ces loci de manière relativement efficace ((Brunet et al., 2009) et données non publiées). L'intérêt principal de ce système réside dans la possibilité de reproduire des translocations chromosomiques dans un contexte génomique et un environnement moléculaire physiologiques, avec échanges réel de morceaux de chromosomes. La réparation des CDB induites par la transfection des trois ZFN dans les cellules peut aboutir à la formation de trois translocations caractérisées chacune par la formation de deux chromosomes dérivatifs (Figure 1.3).

La quantification des translocations formées a été effectuée par une technique de PCR nichée associée à un crible en plaque 96 puits (Brunet et al., 2009).

Pour ce faire, les cellules traitées avec les ZFN sontensemencées dans une plaque 96 puits. Deux à quatre jours plus tard, les cellules sont lysées et une première PCR est effectuée avec des amorces permettant d'amplifier la jonction des chromosomes transloqués (Figure 1.4). Les translocations chromosomiques étant des événements rares, une seconde PCR dite nichée est réalisée pour augmenter l'efficacité et la spécificité de la réaction d'amplification. Cette

seconde réaction d'amplification est effectuée en présence de SYBR Green pour permettre la détection par fluorescence des produits amplifiés (Figure 1.4).

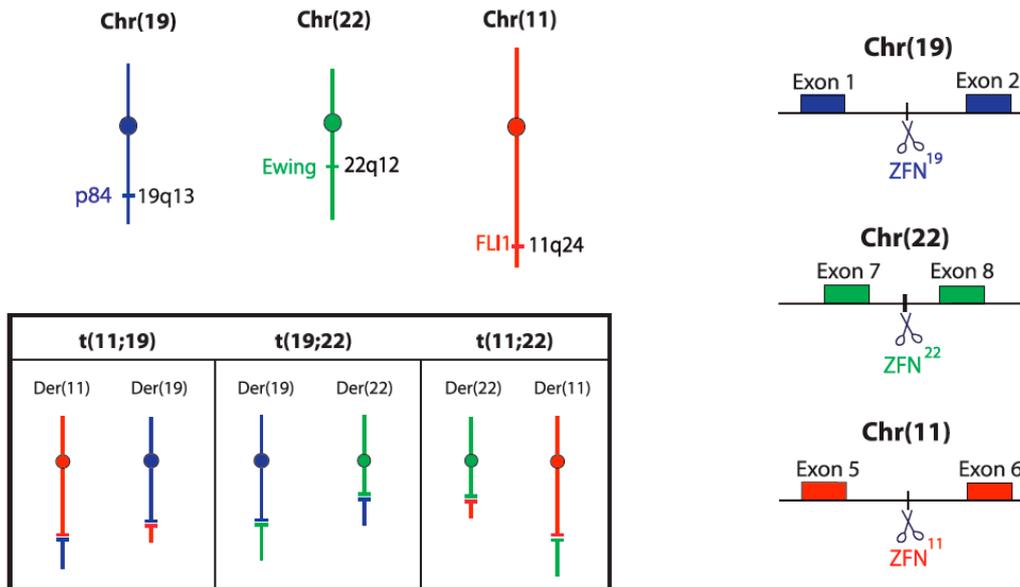


Figure 1.3 : Le système expérimental de formation des translocations

Trois ZFN ciblent les chromosomes 11 (gène *FLI1*, entre les exons 5 et 6), 19 (gène *P84*, entre les exons 1 et 2) ou 22 (gène *EWS*, entre les exons 7 et 8). Les 3 translocations qui peuvent se produire donnent chacune 2 chromosomes dérivatifs que sont t(11;19) : der(11) et der(19), t(19;22) : der(19) et der(22) et t(11;22) : der(11) et der(22), cette dernière translocation étant caractéristique du sarcome d'Ewing.

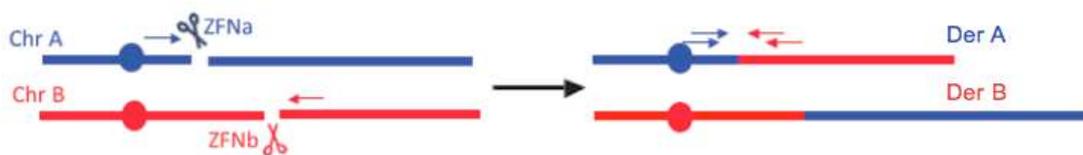


Figure 1.4 : Principe de détection par PCR nichée de la formation de translocations chromosomiques

Lorsque qu'une translocation se forme entre le Chromosome A (Chr A) et le Chromosome B (Chr B) suite à la coupure par les ZFN, l'utilisation d'amorces sur chacun des chromosomes permet la détection du chromosome dérivatif A (Der A). L'utilisation d'amorces nichées lors de la seconde PCR permet l'amplification efficace d'un fragment spécifique de ce chromosome dérivatif. La même expérience peut être réalisée pour amplifier l'autre chromosome dérivatif (Der B).

Les puits donnant un signal d'amplification positif à l'issue de la deuxième PCR sont analysés par dénaturation thermique pour discriminer entre les produits de PCR non spécifiques et les dimères d'amorces d'une part, et les produits spécifiques correspondant au produit de

translocation d'autre part (Figure 1.5). Lors de la mise au point de cette technique, il a également été vérifié par séquençage que les produits amplifiés correspondaient bien aux translocations étudiées.

La fréquence de translocation peut être calculée, dans la configuration où il ne s'est produit qu'une translocation par puits, comme le nombre de puits positifs à l'issue du criblage PCR, sur le nombre total de cellulesensemencées après transfection des ZFN. Dans le cas où un nombre important de puits positifs seraient détectés sur la plaque (plus de 20), le calcul du nombre réel de translocations par une fonction de distribution beta cumulative permet de corriger la sous-estimation due à l'occurrence de plus d'une translocation par puits.

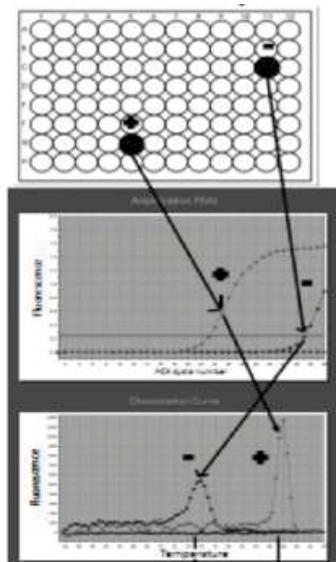


Figure 1.5 : Méthode de quantification de la fréquence des translocations

Les puits donnant un signal d'amplification sont analysés par dénaturation thermique. Les produits spécifiques (puits +) ont une taille supérieure à 100 paires de bases, ce qui correspond à une température de fusion proche de 85°C. Les dimères d'amorces (puits -) ont une température de fusion beaucoup plus faible, d'environ 50°C.

La fréquence de translocation entre les différents loci impliqués a ensuite été normalisée par l'efficacité de coupure de chacune des ZFN, quantifiée par un test Surveyor.

Cette technique, qui repose sur l'utilisation de l'enzyme CEL I extraite du céleri, permet de quantifier les mutations induites lors de la réparation des dommages provoqués par les ZFN sur leur cible. En effet, une fraction des CDB engendrées par les ZFN est en partie réparée de manière infidèle, générant ainsi des mutations (ponctuelles, délétions...) sur la séquence cible. Le mécanisme de réparation impliqué dans ces mutations est le NHEJ, qui correspond au mécanisme le plus efficace de réparation des CDB dans les cellules de mammifère. Plus une

ZFN produit des CDB de manière efficace, plus la quantité de mutations générées sur sa cible sera importante. On peut donc assimiler le pourcentage de mutations détectées sur l'ADN cible des cellules traitées à l'efficacité de coupure du ZFN.

CEL I est une endonucléase qui clive spécifiquement l'ADN double-brin après avoir reconnu un mésappariement. Le protocole expérimental mis en oeuvre pour la détection de la fréquence de mutations débute par une PCR autour du locus ciblé par chacun des ZFN sur l'ADN des cellules traitées. Les fragments amplifiés sont alors dénaturés puis ré-hybridés rapidement pour générer des hétéroduplexes d'ADN, composés d'un brin de séquence sauvage et d'un brin de séquence mutée. Le traitement par la nucléase CEL I induit alors le clivage de ces hétéroduplexes au niveau des mésappariements et l'analyse sur gel des produits digérés permet ensuite de déterminer le pourcentage de mutations sur la cible (Figure 1.6).

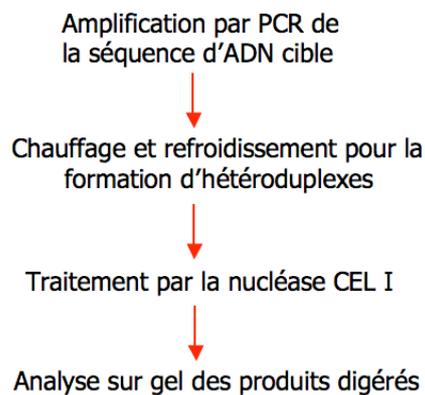


Figure 1.6 : Les quatre étapes expérimentales du test Surveyor

Enfin, la distance nucléaire entre chaque paire de loci ciblés a été déterminée en parallèle par des expériences de Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) préservant la structure tridimensionnelles des noyaux, sur des cellules MES avant traitement par les ZFN.

La tâche qui m'a été confiée dans ce projet consistait à synthétiser des sondes fluorescentes, à effectuer des expériences de FISH et à réaliser l'acquisition des images en microscopie. L'analyse des images pour les mesures de distances a ensuite été réalisée à l'aide d'un logiciel développé au laboratoire par J. Ollion.

2. Résultats

La première étape du projet a consisté à quantifier les fréquences de formation des translocations suite au traitement des cellules MES par les ZFN ciblant les chromosomes 11, 19 et 22. Le résultat de cette quantification est présenté sur la Figure 2.1.

On peut tout d'abord remarquer que les trois types de translocations, à savoir $t(11;22)$, $t(11;19)$ et $t(19;22)$, sont toutes détectées dans les cellules MES suite à l'électroporation des trois plasmides codant pour les ZFN. Ce résultat confirme donc l'efficacité de cette approche pour générer des translocations ciblées en cellules. La fréquence de formation diffère cependant entre les trois types de translocations puisque l'on détecte quatre fois plus de translocations $t(19;22)$ que de translocations $t(11;19)$ ou $t(11;22)$.

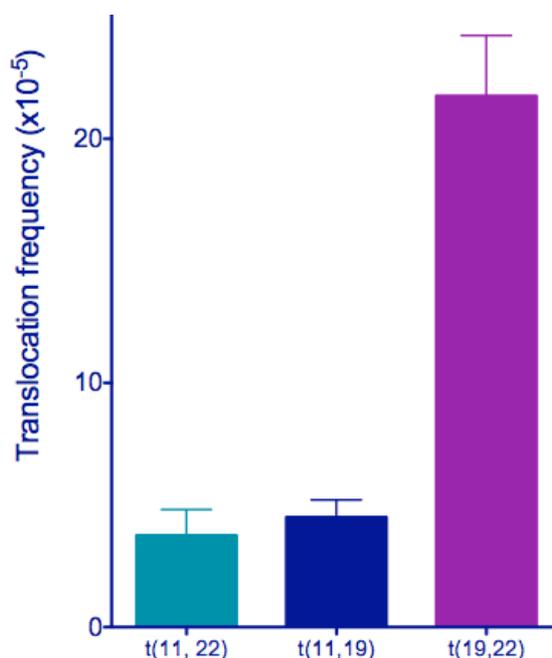


Figure 2.1 : Fréquences d'apparition des translocations $t(11;22)$, $t(11;19)$ ou $t(19;22)$ détectées pour 10^5 cellules MES traitées par les ZFN 11, 19 et 22

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence de fréquence de translocation entre les trois événements considérés. On peut tout d'abord imaginer que les efficacités d'amplification par PCR diffèrent entre les divers chromosomes dérivatifs, ceci pouvant aboutir à une sous-estimation des fréquences de $t(11;22)$ et $t(11;19)$. Cette hypothèse a été investiguée et les efficacités d'amplification pour les différents chromosomes transloqués se sont révélées similaires (Figure 2.2). Nous n'observons en effet pas de différences majeures d'efficacités

d'amplification pour les chromosomes dérivatifs étudiés. La différence de fréquence d'apparition des translocations $t(11;22)$ et $t(11;19)$, par rapport à $t(19;22)$, ne peut donc être directement attribuée à une mauvaise amplification des produits détectés par PCR correspondant à $t(11;22)$ et $t(11;19)$.

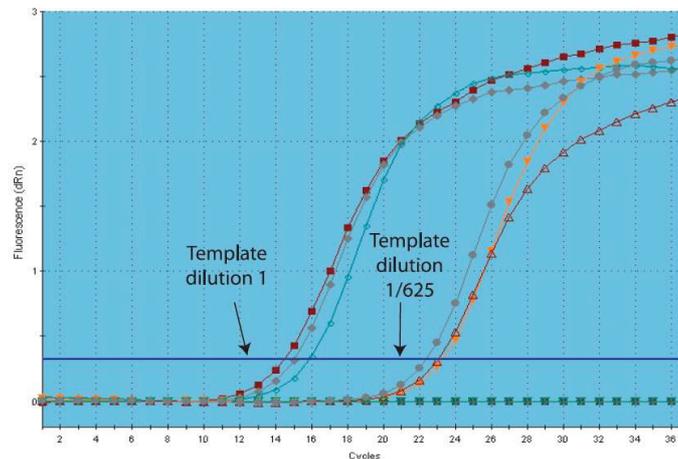


Figure 2.2 : Amplification par PCR des translocations

$t(11;19)$: Der(11), $t(19;22)$: Der(19) et $t(11;22)$: Der(11) clonées en plasmide

La PCR est effectuée à partir de deux dilutions d'ADN matrice (1 et 1/625) en présence de SYBR Green. Dans les deux cas, les Ct obtenus pour les trois chromosomes dérivatifs à partir d'une quantité identique d'ADN matrice témoignent d'une efficacité d'amplification similaire pour les 3 différents produits de PCR.

Une seconde hypothèse pour expliquer les différences de fréquence d'apparition des trois translocations serait une faible efficacité de coupure du ZFN ciblant le chromosome 11, impliqué à la fois dans $t(11;22)$ et $t(11;19)$, résultant en une faible probabilité de former une translocation avec ce chromosome. La quantification des efficacités de coupure de chaque ZFN par test Surveyor a été réalisée en parallèle de la quantification des translocations, afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse (Figure 2.3).

Le résultat du test Surveyor révèle des efficacités de coupure du même ordre de grandeur pour les trois ZFN utilisées, avec 13, 18 et 21% de mutations détectées sur les chromosomes 19, 22 et 11 respectivement. L'efficacité de coupure de la ZFN ciblant le chromosome 11 est même légèrement supérieure à celle des deux autres ZFN, tandis que le pourcentage de mutations détectées pour la ZFN ciblant le chromosome 19 est le moins élevé des trois.

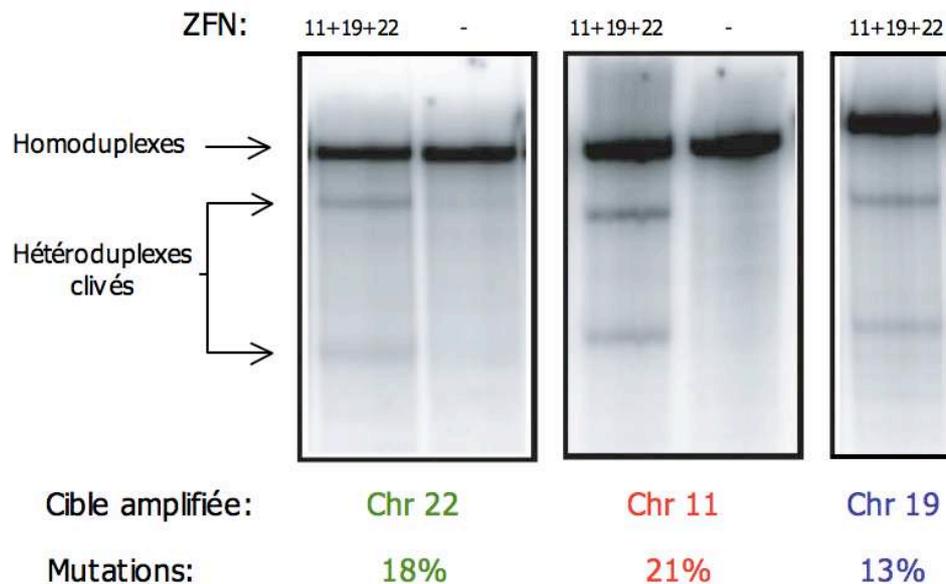


Figure 2.3 : Efficacités de coupure des ZFN ciblant les chromosomes 22, 11 et 19

Le pourcentage de mutations est détecté par quantification de la fraction d'hétéroduplexes clivés (bandes de plus petite taille) suite à un test Surveyor sur l'ADN de cellules MES transfectées par les trois plasmides codant pour les ZFN ciblant les chromosomes 11, 19 et 22.

Le fait que la fréquence de formation de t(19;22) soit plus de quatre fois supérieure aux fréquences de formation de t(11;22) et t(11;10) n'est donc pas en lien avec l'efficacité de coupure des ZFN mais résulterait plutôt d'une capacité des CDB générées sur les chromosomes 19 et 22 à être réparées entre elles pour former des translocations, de manière particulièrement efficace.

Pour comprendre le lien entre distance des loci ciblés et fréquence d'apparition des translocations, la mesure des distances entre les différents loci ciblés par les ZFN a été effectuée à partir d'expériences de FISH sur les cellules MES non traitées. Trois sondes fluorescentes s'hybridant chacune à proximité des loci ciblés ont été utilisées pour le FISH. Un exemple d'image acquise au microscope est présenté sur la Figure 2.4, où les projections maximales en z des quatre filtres utilisés pour l'acquisition ont été combinées. On y distingue bien deux signaux FISH pour chaque chromosome, avec parfois un signal dédoublé correspondant probablement à un chromosome répliqué ou peu condensé (signal vert du chromosome 22, dans le noyau en bas à droite).

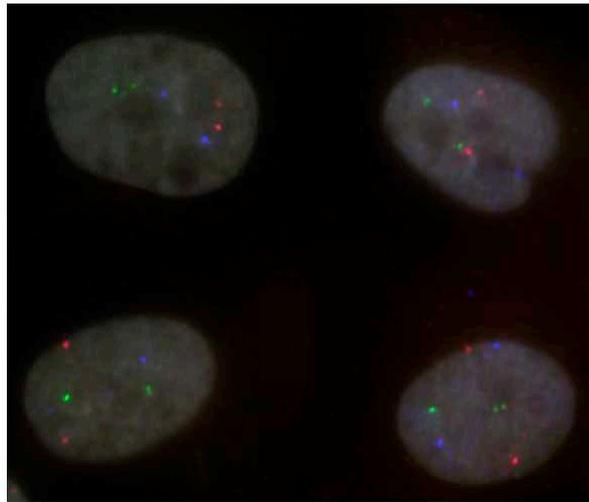


Figure 2.4 : FISH sur les cellules MES, avant traitement de l'image par le logiciel d'analyse de distances

En rouge : sonde chromosome 11, en vert : sonde chromosome 22, en bleu : sonde chromosome 19, en gris : marquage nucléaire au DAPI

Après traitement des images par le logiciel élaboré au laboratoire, les distances entre les différents signaux FISH pour chaque couple de loci ont été calculées et la courbe cumulative correspondante, obtenue avec le logiciel Prism, est présentée sur la Figure 2.5.

Le résultat de l'analyse de distance révèle que les loci des chromosomes 22 et 19 sont globalement plus proches dans les noyaux des cellules MES que les loci situés sur les chromosomes 11 et 22 ou 11 et 19. Les deux loci les plus proches spatialement dans le noyau sont donc ceux dont la fréquence de translocation est la plus importante dans ces cellules (fréquence de $t(19;22)$ sur la Figure 2.1).

Cependant, il est également visible sur la Figure 2.5 que la proximité nucléaire du couple de loci (11,22) est supérieure à celle du couple (11,19), alors que la fréquence des translocations $t(11;22)$ et $t(11;19)$ est similaire (Figure 2.1). Ces résultats devront toutefois être confirmés par d'autres expériences.

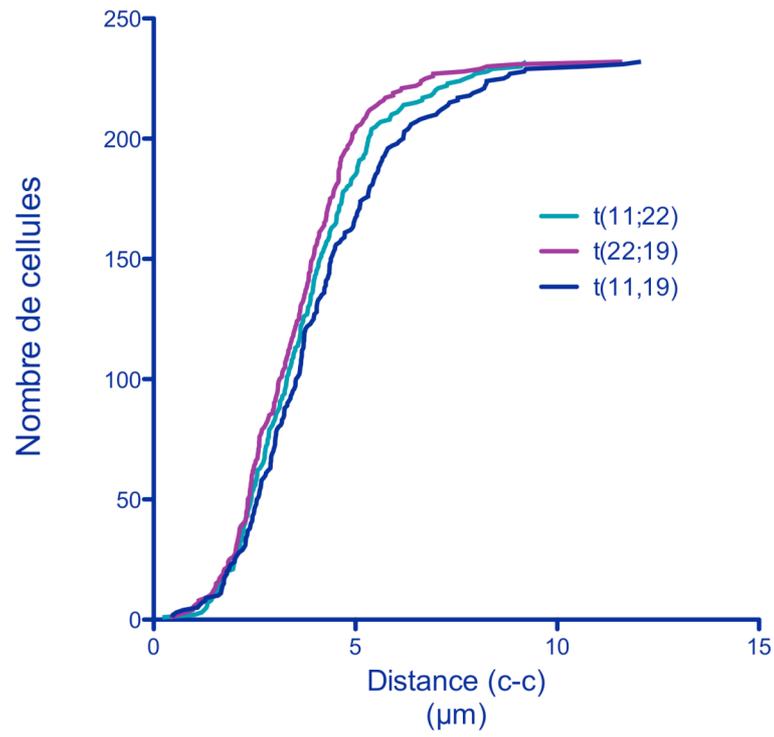


Figure 2.5 : Répartition cumulative des distances calculées en µm entre chaque couple de loci, d'après les expériences de FISH
c-c : distance centre à centre

3. Conclusions et perspectives

L'ensemble de ces expériences a permis de démontrer la formation des trois translocations attendues après l'induction de CDB ciblées par la technologie ZFN sur les chromosomes 11, 19 et 22, dans des cellules humaines souches mésenchymateuses. Après vérification que l'efficacité de coupure des trois ZFN était équivalente, la quantification des fréquences de translocation a révélé que la translocation t(19;22) se produisait beaucoup plus fréquemment dans ces cellules que les translocations t(11;22) et t(11;19).

Les mesures de distances entre ces différents loci ont révélé que le couple de loci ayant la plus grande proximité nucléaire correspondait à celui qui forme le plus grand nombre de translocations dans ces cellules. Cependant, la différence de proximité spatiale observée pour les couples de loci (11,22) et (11,19) n'est pas corrélée avec leur fréquence de translocation puisque t(11;22) et t(11;19) sont formées à une fréquence statistiquement identique. Même si la composante "distance nucléaire" contribue très probablement au choix du partenaire de translocation, aucune corrélation directe ne peut donc être formellement établie à partir de ces expériences préliminaires.

Des expériences similaires sont actuellement en cours sur des cellules humaines de la rétine RPE1. D'après les premiers résultats, il semble que les fréquences de translocation obtenues soient proches de celles mesurées dans les cellules MES, tandis que des différences dans les distances mesurées apparaissent. L'analyse ultérieure des données sur diverses lignées (RPE1 et ostéoblastes différenciés à partir des cellules MES) et l'utilisation d'une quatrième ZFN ciblant un loci sur le chromosome X devrait permettre de compléter nos données et de répondre clairement à la question : existe-t-il une corrélation directe entre la fréquence de translocation et la proximité spatiale des loci où se passent les CDB initiales?

4. Matériels & Méthodes

Synthèse des sondes FISH chromosome 19 par random-priming

Les sondes utilisées pour le FISH sur le chromosome 19 ont été synthétisées à partir des BAC CTD-250E13, CTC-550B14 et CTD-2587H24 (Invitrogen). Les BAC sont extraits de cultures bactériennes avec le Large-Construct Kit (Qiagen). Le "random-priming" est réalisé sur 100ng de BAC dilués dans une solution tampon contenant des amorces aléatoires (kit Bioprime, Invitrogen). La solution est chauffée 8 minutes à 100°C puis placée 10 minutes à 4°C. Dans un deuxième temps, le tube reçoit 10 unités du fragment Klenow de l'ADN Polymérase I (Invitrogen), 100µM de dATP/dGTP/dCTP, 65µM de dTTP et 65µM de dUTP couplés à la Cyanine 5 (Roche). L'élongation des amorces se fait toute à la nuit à 37°C. Le lendemain, la Klenow est inactivée pendant 20 minutes à 72°C, les sondes sont précipitées à l'éthanol puis resuspendues dans un tampon Tris pH 7.4 10mM et conservées à -20°C. Les sondes issues de ces trois BAC (E13Y5, B14Y5 et H24Y5) ont été testées en FISH3D et c'est la sonde H24Y5 qui a été choisie pour les expériences futures.

Expériences de FISH

70 000 cellules MES sontensemencées sur lamelle de verre dans du milieu α -MEM + 10% SVF. Le lendemain, les cellules sont lavées deux fois au PBS avant d'être fixées 10 minutes au paraformaldéhyde 4% pH 7.2 (EMS). Après trois lavages de 5 minutes au PBS, les cellules sont perméabilisées par un bain de 10 minutes de SSC2X/Triton X100 0.5%. Après deux lavages au PBS, les cellules sont traitées pendant 5 minutes à l'HCl 0.1N et sont à nouveau rincées deux fois au PBS. Les lamelles sont ensuite placées 30 minutes dans un bain SSC2X/formamide 50% (Fluka).

La préparation de la sonde H24Y5 se fait le jour même de la manière suivante : la sonde random-priming est précipitée à l'éthanol avec une quantité 15 fois supérieure d'ADN compétiteur Cot I (Invitrogen). La sonde et l'ADN Cot I sont ensuite resuspendus dans un volume de tampon d'hybridation permettant d'obtenir une concentration finale de 20ng/µl de sonde et 300ng/µl d'ADN compétiteur. Les différentes sondes FISH utilisées sont la sonde random-priming H24Y5 et les sondes commerciales Oncosight FLI1/EWSR1 (Cytocell) et Vysis EWSR1 (Abott). Les sondes sont déposées seules ou combinées entre elles à raison de 10µl total par lamelle. Après dénaturation 3 minutes à 85°C puis descente rapide à 37°C, les lamelles sont placées la nuit à 37°C pour l'hybridation des sondes.

Le lendemain, les lamelles sont rincées deux fois 5 minutes dans un bain SSC2X/formamide 50% à 37°C, puis deux fois 5 minutes dans un bain SSC2X à 37°C. Les noyaux sont colorés au DAPI 0.1µg/ml pendant 5 minutes et les lamelles sont montées dans du milieu PPD8. Les lames sont ensuite observées avec un microscope à fluorescence Leica et l'acquisition des stacks d'images est effectuée avec le logiciel Metamorph.

Bibliographie

Aartsma-Rus, A., and van Ommen, G.J. (2007). Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* *13*, 1609-1624.

Aartsma-Rus, A., and van Ommen, G.J. (2009). Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur J Hum Genet* *18*, 146-153.

Aigner, A. (2008). Cellular delivery in vivo of siRNA-based therapeutics. *Curr Pharm Des* *14*, 3603-3619.

Alam, M.R., Ming, X., Fisher, M., Lackey, J.G., Rajeev, K.G., Manoharan, M., and Juliano, R.L. (2011). Multivalent Cyclic RGD Conjugates for Targeted Delivery of Small Interfering RNA. *Bioconjug Chem*.

Baker, B.F., Lot, S.S., Condon, T.P., Cheng-Flournoy, S., Lesnik, E.A., Sasmor, H.M., and Bennett, C.F. (1997). 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* *272*, 11994-12000.

Bareford, L.M., Phelps, M.A., Foraker, A.B., and Swaan, P.W. (2008). Intracellular processing of riboflavin in human breast cancer cells. *Mol Pharm* *5*, 839-848.

Bareford, L.M., and Swaan, P.W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* *59*, 748-758.

Bennett, C.F., and Swayze, E.E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *50*, 259-293.

Bhindi, R., Fahmy, R.G., Lowe, H.C., Chesterman, C.N., Dass, C.R., Cairns, M.J., Saravolac, E.G., Sun, L.Q., and Khachigian, L.M. (2007). Brothers in arms: DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies. *Am J Pathol* *171*, 1079-1088.

Boutimah-Hamoudi, F., Leforestier, E., Senamaud-Beaufort, C., Nielsen, P.E., Giovannangeli, C., and Saison-Behmoaras, T.E. (2007). Cellular antisense activity of peptide nucleic acid (PNAs) targeted to HIV-1 polypurine tract (PPT) containing RNA. *Nucleic Acids Res* *35*, 3907-3917.

- Braasch, D.A., and Corey, D.R. (2002). Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* *41*, 4503-4510.
- Braasch, D.A., Liu, Y., and Corey, D.R. (2002). Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* *30*, 5160-5167.
- Brenner, B.M., Deen, W.M., and Robertson, C.R. (1976). Determinants of glomerular filtration rate. *Annu Rev Physiol* *38*, 11-19.
- Brunet, E., Alberti, P., Perrouault, L., Babu, R., Wengel, J., and Giovannangeli, C. (2005). Exploring cellular activity of locked nucleic acid-modified triplex-forming oligonucleotides and defining its molecular basis. *J Biol Chem* *280*, 20076-20085.
- Brunet, E., Simsek, D., Tomishima, M., DeKolver, R., Choi, V.M., Gregory, P., Urnov, F., Weinstock, D.M., and Jasin, M. (2009). Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 10620-10625.
- Burgess, C.M., Smid, E.J., and van Sinderen, D. (2009). Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *Int J Food Microbiol* *133*, 1-7.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37-44.
- Crooke, S.T., Lemonidis, K.M., Neilson, L., Griffey, R., Lesnik, E.A., and Monia, B.P. (1995). Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes. *Biochem J* *312* (Pt 2), 599-608.
- De Clercq, E., Eckstein, E., and Merigan, T.C. (1969). [Interferon induction increased through chemical modification of a synthetic polyribonucleotide]. *Science* *165*, 1137-1139.
- Dikmen, Z.G., Gellert, G.C., Jackson, S., Gryaznov, S., Tressler, R., Dogan, P., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2005). In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res* *65*, 7866-7873.
- Dominski, Z., and Kole, R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8673-8677.
- Du, L., and Gatti, R.A. (2009). Progress toward therapy with antisense-mediated splicing modulation. *Curr Opin Mol Ther* *11*, 116-123.
- Duca, M., Vekhoff, P., Oussedik, K., Halby, L., and Arimondo, P.B. (2008). The triple helix: 50 years later, the outcome. *Nucleic Acids Res* *36*, 5123-5138.
- Eisen, J.S., and Smith, J.C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* *135*, 1735-1743.

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494-498.
- Esau, C.C., and Monia, B.P. (2007). Therapeutic potential for microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* *59*, 101-114.
- Faria, M., Spiller, D.G., Dubertret, C., Nelson, J.S., White, M.R., Scherman, D., Helene, C., and Giovannangeli, C. (2001). Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and in vivo. *Nat Biotechnol* *19*, 40-44.
- Fedor, M.J., and Williamson, J.R. (2005). The catalytic diversity of RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 399-412.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Folini, M., Bandiera, R., Millo, E., Gandellini, P., Sozzi, G., Gasparini, P., Longoni, N., Binda, M., Daidone, M.G., Berg, K., *et al.* (2007). Photochemically enhanced delivery of a cell-penetrating peptide nucleic acid conjugate targeting human telomerase reverse transcriptase: effects on telomere status and proliferative potential of human prostate cancer cells. *Cell Prolif* *40*, 905-920.
- Folini, M., Berg, K., Millo, E., Villa, R., Prasmickaite, L., Daidone, M.G., Benatti, U., and Zaffaroni, N. (2003). Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase. *Cancer Res* *63*, 3490-3494.
- Foraker, A.B., Khantwal, C.M., and Swaan, P.W. (2003). Current perspectives on the cellular uptake and trafficking of riboflavin. *Adv Drug Deliv Rev* *55*, 1467-1483.
- Foraker, A.B., Ray, A., Da Silva, T.C., Bareford, L.M., Hillgren, K.M., Schmittgen, T.D., and Swaan, P.W. (2007). Dynamin 2 regulates riboflavin endocytosis in human placental trophoblasts. *Mol Pharmacol* *72*, 553-562.
- Gao, W.Y., Han, F.S., Storm, C., Egan, W., and Cheng, Y.C. (1992). Phosphorothioate oligonucleotides are inhibitors of human DNA polymerases and RNase H: implications for antisense technology. *Mol Pharmacol* *41*, 223-229.
- Gillmeister, M.P., Betenbaugh, M.J., and Fishman, P.S. (2011). Cellular Trafficking and Photochemical Internalization of Cell Penetrating Peptide Linked Cargo Proteins: A Dual Fluorescent Labeling Study. *Bioconjug Chem*.
- Grunweller, A., Wyszko, E., Bieber, B., Jahnel, R., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2003). Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* *31*, 3185-3193.
- Gryaznov, S.M. (1999). Oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates as potential therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* *1489*, 131-140.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* *35*, 849-857.

Guterstam, P., Lindgren, M., Johansson, H., Tedebark, U., Wengel, J., El Andaloussi, S., and Langel, U. (2008). Splice-switching efficiency and specificity for oligonucleotides with locked nucleic acid monomers. *Biochem J* *412*, 307-313.

Hanvey, J.C., Pepper, N.J., Bisi, J.E., Thomson, S.A., Cadilla, R., Josey, J.A., Ricca, D.J., Hassman, C.F., Bonham, M.A., Au, K.G., *et al.* (1992). Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* *258*, 1481-1485.

Haseloff, J., and Gerlach, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* *334*, 585-591.

Hogset, A., Prasmickaite, L., Selbo, P.K., Hellum, M., Engesaeter, B.O., Bonsted, A., and Berg, K. (2004). Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* *56*, 95-115.

Holladay, S.R., Yang, Z., Kennedy, M.D., Leamon, C.P., Lee, R.J., Jayamani, M., Mason, T., and Low, P.S. (1999). Riboflavin-mediated delivery of a macromolecule into cultured human cells. *Biochim Biophys Acta* *1426*, 195-204.

Hollenstein, M., Hipolito, C.J., Lam, C.H., and Perrin, D.M. (2009). A self-cleaving DNA enzyme modified with amines, guanidines and imidazoles operates independently of divalent metal cations (M²⁺). *Nucleic Acids Res* *37*, 1638-1649.

Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., *et al.* (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* *11*, 263-270.

Huang, S.N., Phelps, M.A., and Swaan, P.W. (2003). Involvement of endocytic organelles in the subcellular trafficking and localization of riboflavin. *J Pharmacol Exp Ther* *306*, 681-687.

Huang, S.N., and Swaan, P.W. (2001). Riboflavin uptake in human trophoblast-derived BeWo cell monolayers: cellular translocation and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* *298*, 264-271.

Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N.W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J Cell Biol* *180*, 905-914.

Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* *21*, 635-637.

Jackson, S.R., Zhu, C.H., Paulson, V., Watkins, L., Dikmen, Z.G., Gryaznov, S.M., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2007). Antiadhesive effects of GRN163L--an oligonucleotide N^{3'}->P^{5'} thio-phosphoramidate targeting telomerase. *Cancer Res* *67*, 1121-1129.

Janowski, B.A., Hu, J., and Corey, D.R. (2006). Silencing gene expression by targeting chromosomal DNA with antigene peptide nucleic acids and duplex RNAs. *Nat Protoc* *1*, 436-443.

Johnson, T., Ouhtit, A., Gaur, R., Fernando, A., Schwarzenberger, P., Su, J., Ismail, M.F., El-Sayyad, H.I., Karande, A., Elmageed, Z.A., *et al.* (2009). Biochemical characterization of riboflavin carrier protein (RCP) in prostate cancer. *Front Biosci* *14*, 3634-3640.

Jones, A.T. (2007). Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* *11*, 670-684.

Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* *23*, 457-462.

Juliano, R., Alam, M.R., Dixit, V., and Kang, H. (2008). Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* *36*, 4158-4171.

Juliano, R., Bauman, J., Kang, H., and Ming, X. (2009). Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Mol Pharm* *6*, 686-695.

Karande, A.A., Sridhar, L., Gopinath, K.S., and Adiga, P.R. (2001). Riboflavin carrier protein: a serum and tissue marker for breast carcinoma. *Int J Cancer* *95*, 277-281.

Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic* *10*, 364-371.

Knudsen, H., and Nielsen, P.E. (1996). Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res* *24*, 494-500.

Koppelhus, U., and Nielsen, P.E. (2003). Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). *Adv Drug Deliv Rev* *55*, 267-280.

Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., and Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* *31*, 147-157.

Kumar, C.K., Yanagawa, N., Ortiz, A., and Said, H.M. (1998). Mechanism and regulation of riboflavin uptake by human renal proximal tubule epithelial cell line HK-2. *Am J Physiol* *274*, F104-110.

Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* *270*, 1628-1644.

Kurreck, J. (2008). *Therapeutic oligonucleotides* (Cambridge, UK, RSC Pub.).

Kurreck, J. (2009). RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* *48*, 1378-1398.

Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., and Erdmann, V.A. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 30, 1911-1918.

Kuzelova, K., and Brault, D. (1994). Kinetic and equilibrium studies of porphyrin interactions with unilamellar lipidic vesicles. *Biochemistry* 33, 9447-9459.

Lacerra, G., Sierakowska, H., Carestia, C., Fucharoen, S., Summerton, J., Weller, D., and Kole, R. (2000). Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9591-9596.

Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., and Orum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198-201.

Lares, M.R., Rossi, J.J., and Ouellet, D.L. (2010). RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 28, 570-579.

Lares, M.R., Rossi, J.J., and Ouellet, D.L. (2011). RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 28, 570-579.

Lecosnier, S., Cordier, C., Simon, P., Francois, J.C., and Saison-Behmoaras, T.E. (2011). A steric blocker of translation elongation inhibits IGF-1R expression and cell transformation. *FASEB J*.

Leonetti, J.P., Mechti, N., Degols, G., Gagnor, C., and Lebleu, B. (1991). Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2702-2706.

Lin, C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., Ju, B.G., Ohgi, K., Zhang, J., Rose, D.W., Fu, X.D., Glass, C.K., *et al.* (2009). Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell* 139, 1069-1083.

Lu, J.J., Langer, R., and Chen, J. (2009). A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Mol Pharm* 6, 763-771.

Mani, R.S., Tomlins, S.A., Callahan, K., Ghosh, A., Nyati, M.K., Varambally, S., Palanisamy, N., and Chinnaiyan, A.M. (2009). Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science* 326, 1230.

Mason, C.W., D'Souza, V.M., Bareford, L.M., Phelps, M.A., Ray, A., and Swaan, P.W. (2006). Recognition, co-internalization, and recycling of an avian riboflavin carrier protein in human placental trophoblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 465-472.

Matsukura, M., Shinozuka, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J.S., and Broder, S. (1987). Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7706-7710.

Mayer, L.D., Hope, M.J., and Cullis, P.R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta* 858, 161-168.

- Ming, X. (2011). Cellular delivery of siRNA and antisense oligonucleotides via receptor-mediated endocytosis. *Expert Opin Drug Deliv* *8*, 435-449.
- Misteli, T., and Soutoglou, E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 243-254.
- Mojzisova, H., Bonneau, S., Maillard, P., Berg, K., and Brault, D. (2009). Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. *Photochem Photobiol Sci* *8*, 778-787.
- Monaco, H.L. (1997). Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J* *16*, 1475-1483.
- Nielsen, P.E. (2010). Peptide nucleic acids (PNA) in chemical biology and drug discovery. *Chem Biodivers* *7*, 786-804.
- Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* *254*, 1497-1500.
- Nishiyama, N., Iriyama, A., Jang, W.D., Miyata, K., Itaka, K., Inoue, Y., Takahashi, H., Yanagi, Y., Tamaki, Y., Koyama, H., *et al.* (2005). Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat Mater* *4*, 934-941.
- Nulf, C.J., and Corey, D. (2004). Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res* *32*, 3792-3798.
- Obad, S., dos Santos, C.O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E.M., *et al.* (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet* *43*, 371-378.
- Oliveira, S., Fretz, M.M., Hogset, A., Storm, G., and Schiffelers, R.M. (2007). Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. *Biochim Biophys Acta* *1768*, 1211-1217.
- Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J., and Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* *557*, 9-23.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* *29*, e45.
- Rana, T.M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 23-36.
- Rao, P.N., Crippin, J., Levine, E., Hunt, J., Baliga, S., Balart, L., Anthony, L., Mulekar, M., and Raj, M.H. (2006). Elevation of serum riboflavin carrier protein in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* *35*, 83-87.

- Rao, P.N., Levine, E., Myers, M.O., Prakash, V., Watson, J., Stolier, A., Kopicko, J.J., Kissinger, P., Raj, S.G., and Raj, M.H. (1999). Elevation of serum riboflavin carrier protein in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *8*, 985-990.
- Rayburn, E.R., and Zhang, R. (2008). Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible? *Drug Discov Today* *13*, 513-521.
- Richardson, C., and Jasin, M. (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* *405*, 697-700.
- Rockwell, P., O'Connor, W.J., King, K., Goldstein, N.I., Zhang, L.M., and Stein, C.A. (1997). Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6523-6528.
- Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A., and Misteli, T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* *34*, 287-291.
- Rowley, J.D. (2008). Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* *112*, 2183-2189.
- Sahay, G., Alakhova, D.Y., and Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* *145*, 182-195.
- Said, H.M., Ortiz, A., Ma, T.Y., and McCloud, E. (1998). Riboflavin uptake by the human-derived liver cells Hep G2: mechanism and regulation. *J Cell Physiol* *176*, 588-594.
- Said, H.M., Ortiz, A., Moyer, M.P., and Yanagawa, N. (2000). Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* *278*, C270-276.
- Said, H.M., Wang, S., and Ma, T.Y. (2005). Mechanism of riboflavin uptake by cultured human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells: possible regulation by an intracellular Ca²⁺-calmodulin-mediated pathway. *J Physiol* *566*, 369-377.
- Santoro, S.W., and Joyce, G.F. (1997). A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4262-4266.
- Sei, S., Yang, Q.E., O'Neill, D., Yoshimura, K., Nagashima, K., and Mitsuya, H. (2000). Identification of a key target sequence to block human immunodeficiency virus type 1 replication within the gag-pol transframe domain. *J Virol* *74*, 4621-4633.
- Serganov, A., and Patel, D.J. (2007). Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat Rev Genet* *8*, 776-790.
- Shieh, M.J., Peng, C.L., Lou, P.J., Chiu, C.H., Tsai, T.Y., Hsu, C.Y., Yeh, C.Y., and Lai, P.S. (2008). Non-toxic phototriggered gene transfection by PAMAM-porphyrin conjugates. *J Control Release* *129*, 200-206.
- Shiraishi, T., and Nielsen, P.E. (2006). Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. *FEBS Lett* *580*, 1451-1456.

- Sierakowska, H., Sambade, M.J., Agrawal, S., and Kole, R. (1996). Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12840-12844.
- Simon, P., Decout, J.L., and Fontecave, M. (2006). Sequence-specific nucleic acid damage induced by peptide nucleic acid conjugates that can be enzyme-activated. *Angew Chem Int Ed Engl* *45*, 6859-6861.
- Soutoglou, E., and Misteli, T. (2008). On the contribution of spatial genome organization to cancerous chromosome translocations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 16-19.
- Subramanian, V.S., Rapp, L., Marchant, J.S., and Said, H.M. (2011). Role of cysteine residues in cell surface expression of the human riboflavin transporter-2 (hRFT2) in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Summerton, J., and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* *7*, 187-195.
- Swayze, E.E., Siwkowski, A.M., Wancewicz, E.V., Migawa, M.T., Wyrzykiewicz, T.K., Hung, G., Monia, B.P., and Bennett, C.F. (2007). Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* *35*, 687-700.
- Thomas, T.P., Choi, S.K., Li, M.H., Kotlyar, A., and Baker, J.R., Jr. (2010). Design of riboflavin-presenting PAMAM dendrimers as a new nanoplatform for cancer-targeted delivery. *Bioorg Med Chem Lett* *20*, 5191-5194.
- Toomey, E.C., Schiffman, J.D., and Lessnick, S.L. (2010). Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene* *29*, 4504-4516.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., and Aigner, A. (2005). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* *12*, 461-466.
- Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., and Holmes, M.C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* *435*, 646-651.
- Usman, N., and Blatt, L.M. (2000). Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J Clin Invest* *106*, 1197-1202.
- Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hokfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren, K., *et al.* (2000). Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5633-5638.
- Walder, R.Y., and Walder, J.A. (1988). Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 5011-5015.

- Walev, I., Bhakdi, S.C., Hofmann, F., Djonder, N., Valeva, A., Aktories, K., and Bhakdi, S. (2001). Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3185-3190.
- Wang, L.D., Zhou, F.Y., Li, X.M., Sun, L.D., Song, X., Jin, Y., Li, J.M., Kong, G.Q., Qi, H., Cui, J., *et al.* (2010). Genome-wide association study of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese subjects identifies susceptibility loci at PLCE1 and C20orf54. *Nat Genet* *42*, 759-763.
- Weinstock, D.M., Richardson, C.A., Elliott, B., and Jasin, M. (2006). Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* *5*, 1065-1074.
- Whitehead, K.A., Langer, R., and Anderson, D.G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 129-138.
- Wu, H., Lima, W.F., Zhang, H., Fan, A., Sun, H., and Crooke, S.T. (2004). Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem* *279*, 17181-17189.
- Wu, Q., Huang, L., and Zhang, Y. (2009). The structure and function of catalytic RNAs. *Sci China C Life Sci* *52*, 232-244.
- Yamamoto, S., Inoue, K., Ohta, K.Y., Fukatsu, R., Maeda, J.Y., Yoshida, Y., and Yuasa, H. (2009). Identification and functional characterization of rat riboflavin transporter 2. *J Biochem* *145*, 437-443.
- Yao, Y., Yonezawa, A., Yoshimatsu, H., Masuda, S., Katsura, T., and Inui, K. (2010). Identification and comparative functional characterization of a new human riboflavin transporter hRFT3 expressed in the brain. *J Nutr* *140*, 1220-1226.
- Yonezawa, A., Masuda, S., Katsura, T., and Inui, K. (2008). Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter, RFT1. *Am J Physiol Cell Physiol* *295*, C632-641.
- Zamaratski, E., Pradeepkumar, P.I., and Chattopadhyaya, J. (2001). A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J Biochem Biophys Methods* *48*, 189-208.
- Zamecnik, P.C., and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 280-284.
- Zempleni, J., and Mock, D.M. (2000). Proliferation of peripheral blood mononuclear cells increases riboflavin influx. *Proc Soc Exp Biol Med* *225*, 72-79.
- Zimmermann, T.S., Lee, A.C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M.N., Harborth, J., Heyes, J.A., Jeffs, L.B., John, M., *et al.* (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* *441*, 111-114.

Résumé

Les oligonucléotides antisens et leurs analogues, tels que les Peptide Nucleic Acids (PNA), ont la capacité d'inhiber ou de moduler l'expression d'un gène cible, de manière spécifique de séquence. Leur utilisation pour des applications thérapeutiques est cependant limitée par leur faible internalisation cellulaire ou leur mauvaise localisation intracellulaire, et nécessite le développement de stratégies efficaces de vectorisation. La Riboflavine, ou vitamine B2, est une vitamine essentielle qui a les caractéristiques requises pour être potentiellement utilisée en tant qu'agent ciblant de vectorisation. Le travail accompli au cours de ce projet de thèse a permis de démontrer la capacité de deux dérivés de la Riboflavine, la Flavine et le Lumichrome, à induire une internalisation par endocytose de PNA conjugués, dans plusieurs lignées cellulaires. En outre, un phénomène d'internalisation photochimique induit par la Rhodamine a été mis en évidence avec des double-conjugués Flavine ou Lumichrome - PNA - Rhodamine et conduit à une sortie efficace des endosomes de ces conjugués. Ce travail de thèse a donc permis de caractériser un conjugué trifonctionnel pour l'internalisation et la libération cytoplasmique de molécules bioactives.

Mots clés: oligonucléotides, Peptide Nucleic Acids, conjugués, vectorisation, vitamine B2

Abstract

Antisense oligonucleotides and analogs, such as Peptide Nucleic Acids (PNA), are valuable tools to inhibit or modulate gene expression in a sequence-specific manner. Their successful application for therapeutic purposes is however hampered by poor cellular uptake or incorrect intracellular localization, and requires the development of efficient delivery strategies. Riboflavin, or vitamin B2, is an essential vitamin that could potentially be used as a targeting delivery ligand. We demonstrate in this PhD work the ability of two Riboflavin derivatives, Flavin and Lumichrome, to promote endocytosis-mediated internalization of PNA conjugates in several cell lines. Furthermore, a phenomenon of Photochemical Internalization produced by Rhodamine has been characterized using Flavin or Lumichrome - PNA - Rhodamine conjugates and is responsible for an efficient release of these conjugates from endosomes. This PhD work has thus led to the characterization of a trifunctional conjugate for the internalization and cytoplasmic delivery of bioactive molecules.

Keywords: oligonucleotides, Peptide Nucleic Acids, conjugates, delivery, vitamin B2