HAL
open science

Stratégie du leurre moléculaire en thérapie génique : ciblage de facteurs de transcription par un minicercle d'ADN multisites et étude de l'interaction entre l'ADN platiné et NF-κB

Thomas Thibault

To cite this version:

Thomas Thibault. Stratégie du leurre moléculaire en thérapie génique : ciblage de facteurs de transcription par un minicercle d'ADN multisites et étude de l'interaction entre l'ADN platiné et NF-κB. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2012. Français. NNT : 2012ORLE2069 . tel-01124106

HAL Id: tel-01124106

https://theses.hal.science/tel-01124106v1

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :

Thomas THIBAULT

soutenue le : 18 Décembre 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Stratégie du leurre moléculaire en thérapie génique : ciblage de facteurs de transcription par un minicercle d'ADN multisites et étude de l'interaction entre l'ADN platiné et NF-κB

THÈSE dirigée par :

M. Jean-Marc Malinge	Chargé de recherche Inserm
M. Patrick Midoux	Directeur de recherche CNRS

RAPPORTEURS :

Mme Sophie Bombard	Chargée de recherche CNRS
M. Rémi Fagard	Professeur des universités - Paris 13

JURY :

M. Richard Daniellou	Professeur des universités - Orléans Président du jury
Mme Sophie Bombard	Chargée de recherche CNRS
M. Rémi Fagard	Professeur des universités - Paris 13
M. Jian-Sheng Sun	Professeur au Muséum d'Histoire Naturelle
M. Patrick Midoux	Directeur de recherche CNRS
M. Jean-Marc Malinge	Chargé de recherche Inserm

Remerciements

Je souhaite remercier le Dr. Jean-Malinge qui m'a encadré tout au long de ces trois dernières années. C'est en travaillant ensemble que nous avons pu concevoir et développer les minicercles d'ADN et leur utilisation en tant que leurre moléculaire.

Je tiens également à adresser mes plus sincèreres remerciements au Dr. Patrick Midoux qui a co-encadré ce travail. Un grand merci pour m'avoir soutenu, y compris lorsque les nombreuses difficultés inhérentes à la réalisation d'une thèse se sont produites. Je vous remercie également, ainsi que le Pr. Chantal Pichon, pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire il y a déjà plus de 4 ans, me permettant ainsi d'y réaliser mon master et ma thèse. J'espère avoir été tout au long de ces années à la hauteur de la confiance que vous m'avez accordée.

Je souhaite exprimer ma plus grande gratitude à mes rapporteurs, le Dr. Sophie Bombard et le Pr. Rémi Fagard pour avoir accepté de lire ma thèse et de juger ce travail. J'espère que vous considérerez que ce travail est digne du niveau auquel je prétends aujourd'hui.

Je remercie également le Pr. Jiang-Sheng Sun et le Pr. Richard Daniellou qui ont accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je tiens à remercier les personnes qui ont collaboré à la réalisation des travaux qui ont été soumis, et en particulier, le Pr. Viktor Brabec et son équipe en République Tchèque ainsi que Tereza Muchova pour l'aide apportée lors de ces travaux.

Je tiens à remercier le Pr. Jiři Kozelka pour m'avoir permis de présenter quelques résultats au cours du workshop « Biopolymers : Structure and Dynamics » organisé à Nove Hrady en Octobre 2011.

Je tiens à remercier le Dr. Stéphane Bourg pour les images de modélisation moléculaire

Je tiens à remercier le Dr. Françoise Culard pour nous avoir donné le plasmide codant pour la protéine Abf2.

Je tiens à remercier toute l'équipe « Transfert d'acides nucléiques par des systèmes non viraux ». Quelques mots pour remercier en particulier le Dr. Cristine Goncalvès qui m'a apporté de nombreux conseils et qui a réalisé certaines expériences ayant permis d'orienter ce travail. Un petit clin d'œil particulier à Gilles Breuzard, Julie Lodewick, Ludivine Billiet, Benoit Maury, Jean Pierre Gomez, Patrick Baril, Safia Ezzine, Chloé Leduc, Virginie Malard, Aurore Dissaux et Marie-Pierre Gosselin.

Je remercie les stagiaires de BTS qui ont travaillé avec moi, en particulier Mathilde Martins et Thomas Bouard, et qui m'ont permis de sortir de ma solitude quotidienne dans le laboratoire.

Un grand merci à Sabrina pour son amitié.

Ce travail terminant 9 ans passés à l'université, je prends quelques lignes pour remercier quelques amis de fac qui ont permis de m'apporter une vraie bulle d'oxygène lorsque je les ai revus au cours de ces 3 dernières années.

Le groupe de Limoges : Adrien, Gégé, Agathe, Gaël, Alice, Guillaume, Sébastien, Alexis.

Le groupe d'Orléans : Céline et David, Cassandre, Hubert.

****

Pour finir, mes plus sincères remerciements vont bien sûr à mes parents qui m'ont soutenu tout au long des 9 années que j'ai passé à l'université. Un grand merci pour avoir cru en moi et avoir fait en sorte de m'épauler au maximum afin que je puisse en arriver à ce stade aujourd'hui. Un grand merci pour m'avoir « supporté » au cours de ces 3 dernières années qui ont été particulièrement difficiles. Quoiqu'il en soit, je n'aurai jamais pu présenter ce travail sans votre soutien sans failles, j'espère par conséquent que vous serez fiers des travaux que j'ai pu accomplir.

Un grand remerciement à ma sœur Juliette qui m'a également soutenu ces 9 dernières années. J'espère que tu auras l'occasion de présenter tes travaux dans un manuscrit de thèse dans un futur proche. Et n'oublie pas ….. « C'est pas faux !!!! » …..

Abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ARN-i :	ARN interférent
ARN-m :	ARN massager
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FDA :	Food and Drug Administration
HEK 293 :	Human Embryonic Kidney 293 cells
LNA :	Locked Nucleic Acid
NF-κB :	Nuclear Factor Kappa B
ODN :	Oligodéoxyribonucléotide
OLM :	ODN double brin Leurre Moléculaire
NLS :	Nuclar Localization signal
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PEG :	Polyéthylèneglycol
PEI :	Polyéthylenéimine

Sommaire

Remerciements **2**

Abréviations **5**

Sommaire **6**

Table des illustrations **8**

Contexte scientifique **10**

I) Acides nucléiques thérapeutiques sous forme d'oligonucléotide **12**

I-A) Acides nucléiques ciblant les ARN-m 12

1) Oligonucléotide antisens **13**

2) Les ribozymes **16**

3) ARN interférents **17**

I-B) Acides nucléiques ciblant l'ADN 19

1) Le DNAzyme **19**

2) Oligonucléotides formant une triple hélice **19**

I-C) Acides nucléiques fixant des protéines 20

1) Aptamères **20**

a) Les aptamères extracellulaires 21

b) Les aptamères « decoy-like » 21

c) Les quadruplexes 22

d) Les aptamères peptidiques 23

2) ADN leurres moléculaires **23**

A) ODN leurres moléculaires ciblant une seule protéine 25

i) Mécanisme de la stratégie du leurre moléculaire 26

ii) Développement thérapeutique de la stratégie du leurre moléculaire 35

Essais thérapeutiques visant à tester l'efficacité des OLM sur des patients atteints d'un cancer 35

Utilisation de leurres moléculaires dans les pathologies cardiaques 35

B) ODN leurre moléculaire pour un multiciblage de facteurs de transcription 37

C) Autres leurres moléculaires 39

i) Stratégie « Dbait » 39

ii) Leurre anti ADN méthylase 40

iii) ODN immunostimulant 40
iv) Molécule à activité leurre moléculaire et antisens 41
II) Facteurs de transcription et multiciblage 42
II-A) Les facteurs de transcription 42
1) Généralités sur la transcription et les facteurs de transcription 42
2) Le facteur de transcription NF-κB 45
II-B) Multiciblage 48
III) Les minicercles d'ADN 54
III-A) Minicercles 54
1) Minicercles et nanotechnologies de l'ADN 54
2) Les boucles d'ADN 55
3) Minicercles formés naturellement dans les cellules 56
III-B) Techniques de formation d'un minicercle d'ADN 57
1) Réaction de circularisation de l'ADN par la ligation enzymatique 57
2) Utilisation de tracts d'adénine 57
3) La circularisation de l'ADN par complémentarité de bases 58
4) Ligation chimique par « click chemistry » 58
5) Production de minicercle chez la bactérie 58
6) Caractérisation des minicercles formés 59
Projet de thèse 61
Résultats 63
Article 1 : Résultats brevetés 64
Résultats en cours 105
Article 2 soumis pour publication 150
Conclusion générale et perspectives 184
Bibliographie 186

Table des illustrations

Figure 1. Schéma de fonctionnement des oligonucléotides antisens 13
Figure 2. Modifications chimiques couramment utilisées pour augmenter la stabilité des antisens 14
Figure 3. Schéma de fonctionnement d'un ribozyme sur un ARN cible. 16
Figure 4. Schéma de fonctionnement des ARN interférents. 17
Figure 5. Schéma représentant les liaisons hydrogènes entre bases de l'ADN permettant la formation d'une triple hélice 19
Figure 6. Schéma de la technologie SELEX 21
Figure 7. Repliement de l'apatamère ARN dirigé contre NF-κB (p50)2 montrant la formation d'appariements sous forme de double hélice avec des interactions acides nucléiques/protéine similaires à celles rencontrées avec l'ADN et NF-κB (site κB/NF-κB). 22
Figure 8. Schéma de fonctionnement de la stratégie du leurre moléculaire..... 24
Figure 9. Différents types de leurres moléculaires. 25
Figure 10. Caractéristiques des oligonucléotides modifiés chimiquement utilisés dans la stratégie du leurre moléculaire 26
Figure 11. Modèle atomique de l'enhanceosome situé en amont du gène codant pour l'interféron β. 43
Figure 12. Les différentes classes de facteurs de transcription définies par la base de données Transfac. 45
Figure 13. Structure du dimère NF-κB p50/p65. 46
Figure 14. Schéma du fonctionnement de la voie de signalisation NF-κB dans une cellule. .. 47
Figure 15. Analyse globale de facteurs de transcription impliqués dans le cancer colorectal . 49
Figure 16. Intervention de NF-κB et de Stat3 dans le contrôle de la transcription 50
Figure 17. Séquence du leurre moléculaire multisites utilisé par l'équipe de Wang 52
Figure 18. Séquence du leurre moléculaire multisites utilisé par l'équipe de Morishita 52
Figure 19. Schéma de la molécule rotaxane 54
Figure 20. Utilisation d'un minicercle pour étudier l'effet de la courbure et des contraintes toplogiques de l'ADN sur la transcription 56
Figure 21. Localisation des boites HMG dans la protéine Abf2p 65
Figure 22. Liaison de la protéine Ste11 possédant une boite HMG à l'ADN 65

Tableau 1. Etudes récentes sur la localisation intracellulaire par microscopie de fluorescence d'OLM complexés ou non à des vecteurs chimiques. 34
Tableau 2. NF-κB et Stat3 contrôlent la production de cytokines 50

Contexte scientifique

La thérapie génique consiste à introduire dans une cellule pathologique un acide nucléique médicament. Dans le cas des maladies monogéniques dues à des mutations de l'ADN (myopathie de duchenne, mucoviscidose par exemple) un gène fonctionnel est introduit dans la cellule malade en remplacement du gène déficient responsable de la maladie gräce à la délivrance d'un plasmide d'ADN en double brin de taille importante (5000 paires de base environ). Dans le cas de maladies résultant d'une dérégulation de l'expression génique et ou d'une suractivation du fonctionnement de protéines pathologiques, l'acide nucléique médicament est sous forme d'un oligonucléotide (ODN) ADN ou ARN beaucoup plus court, simple ou double brin. Il existe plusieurs classes de petits oligonucléotides qui peuvent permettre la modulation directe ou indirecte de l'expression d'un gène. Les ODN antisens, les ARN interférents et les ribozymes vont agir au niveau post-transcriptionnel (sur l'ARN-m). Les DNAzymes et les triples hélices vont agir directement sur la transcription. Les aptamères et les leurres moléculaires vont agir au niveau pré-transcriptionnel puisqu'ils peuvent agir sur les facteurs de transcription, diminuant l'expression de gènes cibles. La thérapie génique utilisant des acides nucléiques médicaments offre donc un très grand nombre d'applications thérapeutiques dans le domaine de la santé humaine. Cette thérapie moléculaire est spécifique et facilement adaptable à différentes cibles thérapeutiques et donc à différentes maladies.

Une limitation à une utilisation large de cette stratégie en thérapie est le mode de délivrance de l'acide nucléique vers sa cible thérapeutique. Notre équipe « transfert d'acides nucléiques par des systèmes non viraux » développe en particulier des méthodes de délivrance d'acides nucléiques non virales. Il existe plusieurs techniques de délivrance des acides nucléiques dans la cellule qui sont soit virales soit non virales. En résumé parmi les techniques de délivrance non virales, il existe principalement deux types : i) les techniques physiques (électroporation, sonoporation ou bombardement par des particules d'or sur lesquelles sont adsorbés les acides nucléiques) ii) les vecteurs chimiques non viraux qui sont classés en 2 grandes catégories : les lipides cationiques et les polymères cationiques. Les vecteurs cationiques permettent de faire des complexes électrostatiques avec les acides nucléiques chargés négativement. Si un acide nucléique est complexé avec des liposomes cationiques, le complexe formé est nommé lipoplexe. Si un acide nucléique est complexé à un polymère cationique, le complexe formé est nommé polyplexe. Enfin, les lipopolyplexes sont

des polyplexes encapsulés dans des liposomes. Ces vecteurs chimiques présentent des avantages par rapport aux vecteurs viraux (faible immunogénicité, faible probabilité d'intégration dans le génome, une taille d'acides nucléiques à transférer quasi sans limite) mais doivent encore être améliorés (biostabilité, toxicité, efficacité et spécificité de délivrance).

Les leurres moléculaires ont été largement étudiés pour inhiber des facteurs de transcription. Au cours des dernières années, le mode de fonctionnement de ces molécules a été bien étudié sans pour autant que de nouveaux leurres moléculaires n'aient été conçus.

Notamment, la plupart des leurres moléculaires créés jusqu'à présent n'ont ciblé qu'un seul facteur de transcription alors que des résultats récents montrent la nécessité de développer des stratégies de multiciblage. Nous avons donc cherché à développer une stratégie de multiciblage protéique basée sur le principe du leurre moléculaire en créant un nouveau type d'acide nucléique de type oligonucléotide ADN utilisable en thérapie génique.

Dans la partie introduction de ce manuscrit, les différentes stratégies utilisant des oligonucléotides thérapeutiques seront décrites. Les oligodésoxyribonucléotides leurres moléculaires seront plus particulièrement détaillés (mécanisme d'action au niveau cellulaire et cibles protéiques, applications thérapeutiques). Ensuite, l'importance du multiciblage protéique et le fonctionnement des facteurs de transcription seront ensuite développés. Enfin, la forme circulaire de l'ADN en thérapie génique et dans différents domaines d'étudede sera décrite. Dans une deuxième et troisième partie, je présenterai respectivement mes résultats et une conclusion générale.

I) Acides nucléiques thérapeutiques sous forme d'oligonucléotide

L'utilisation de petits acides nucléiques à visée thérapeutique a été suggérée pour la première fois en 1978 par Zamecnik et Stephenson à partir de travaux montrant qu'un oligonucléotide simple brin (sb) de 13 bases complémentaire aux extrémités 5' et 3' de l'ARN 35S du virus du sarcome de Rous pouvait inhiber la réplication de ce virus[1,2]. Actuellement, de nombreuses études sont menées en utilisant des acides nucléiques afin d'inhiber directement ou indirectement des facteurs de transcription surexprimés ou suractivés. Le principal avantage à l'utilisation d'oligonucléotides est le temps relativement court pour la mise au point d'une forme thérapeutique en comparaison à la mise au point d'une petite molécule par une approche de chimie plus conventionnelle de relation structure activité[3]. Ceci est dû au fait que les acides nucléiques sont des molécules naturelles et que leur synthèse chimique est aujourd'hui bien maîtrisée. Les oligonucléotides ADN, ARN simple ou double brin vont permettre l'inhibition de la synthèse ou de l'activité de protéines en agissant de façon directe ou indirecte en fonction de la nature de la cible. L'inhibition est indirecte si l'oligonucléotide s'hybride avec l'ARN messager (ARN-m) (comme dans le cas des stratégies utilisant les antisens, les ribozymes, les ARN interférents) ou avec l'ADN (dans le cas de DNAzymes ou de la formation d'une triple hélice). L'inhibition est directe si l'oligonucléotide se lie à la protéine cible (comme avec les aptamères et les leurres moléculaires). L'utilisation des oligonucléotides à visée thérapeutique présente encore néanmoins certaines limitations. Les principaux problèmes recensés sont la dégradation rapide si les oligonucléotides utilisés ne sont pas modifiés, la délivrance dans les cellules, les effets non spécifiques lorsque les ODN sont modifiés chimiquement, la toxicité, l'immunicité et la pharmacocinétique

I-A) Acides nucléiques ciblant les ARN-m

Etant donné que l'ARN messager (ARN-m) est traduit en protéine, l'interaction avec un oligonucléotide sb complémentaire peut conduire à la destruction de l'ARN-m ou au blocage de la traduction de la protéine. L'inhibition importante de la synthèse d'une protéine impliquée dans une pathologie peut conduire à un effet thérapeutique.

1) Oligonucléotide antisens

Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides (ODN) ADN sb de 15 à 25 nucléotides complémentaires d'une séquence présente dans l'ARN-m cible[3]. L'hybridation de l'antisens avec l'ARN-m cible conduit à la formation d'un duplexe ADN/ARN qui après reconnaissance par la RNase H conduit au clivage de l'ARN-m cible et donc à la non synthèse de la protéine (Figure 1A). Ce duplexe ADN/ARN-m peut également bloquer la traduction de l'ARN-m[4] (Figure 1B).

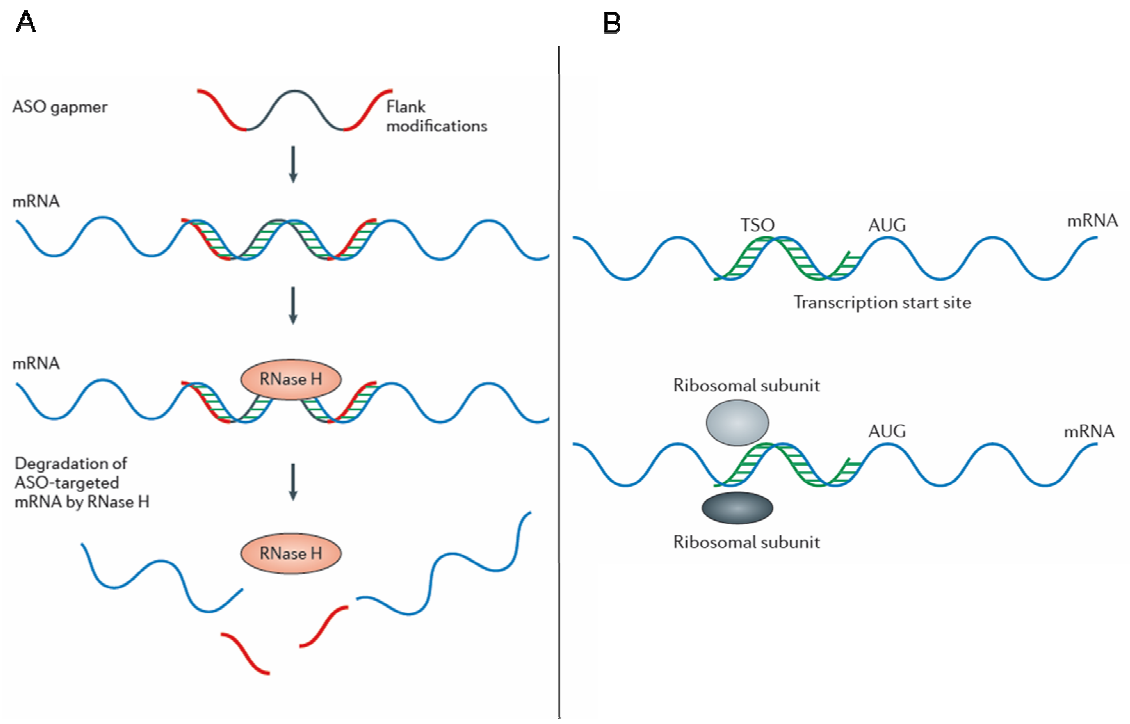


Figure 1. Schéma de fonctionnement des oligonucléotides antisens
D'après Kole et coll[4]
A. Hybridation de l'oligonucléotide antisens avec un ARN-m conduisant à la formation d'un duplexe reconnu par la RNase H qui clive l'ARN-m cible
B. Blocage de la traduction de l'ARN-m par un oligonucléotide antisens.

Cette stratégie comporte quelques contraintes dans le choix des séquences à utiliser. Par exemple, la zone ciblée de l'ARN-m par l'antisens doit être dépourvue de structures secondaires. De plus, l'antisens ne doit pas comporter de motifs CpG ou des tracts de G[3]. Les ODN antisens comprenant des nucléotides en série phosphodiester ne sont pas stables dans les fluides biologiques. Des modifications chimiques permettant d'améliorer leur stabilité ont été développées[5,6]. La principale modification utilisée a été de remplacer les groupements phosphodiesters par des groupements phosphorothioates[7] (Figure 2). Cependant, cette modification induit des effets secondaires et une toxicité cellulaire qui peut être importante[8].

Une deuxième génération de modifications chimiques a été mise au point et consiste à substituer la position 2' du ribose par un groupement méthyle (2'-O-méthyle)[9]. Cette modification présente des effets moins toxiques par rapport à la modification phosphorothioate et une meilleure affinité pour la séquence ARN complémentaire[10]. Cependant, l'ARN-m n'est plus dégradé car la RNase H ne fonctionne plus avec les ODN 2'-O-méthyles[11] et les effets inhibiteurs sont moins importants[12]. Une troisième génération de modification chimique des antisens est représentée par des acides nucléiques fermés (LNA ou locked nucleic acids)[13,14] (Figure 2C). Là encore, la stabilité et l'hybridation avec la séquence complémentaire de l'ARN sont meilleures mais la RNaseH fonctionne peu. L'inhibition de la synthèse protéique est principalement induite par le blocage de la traduction.

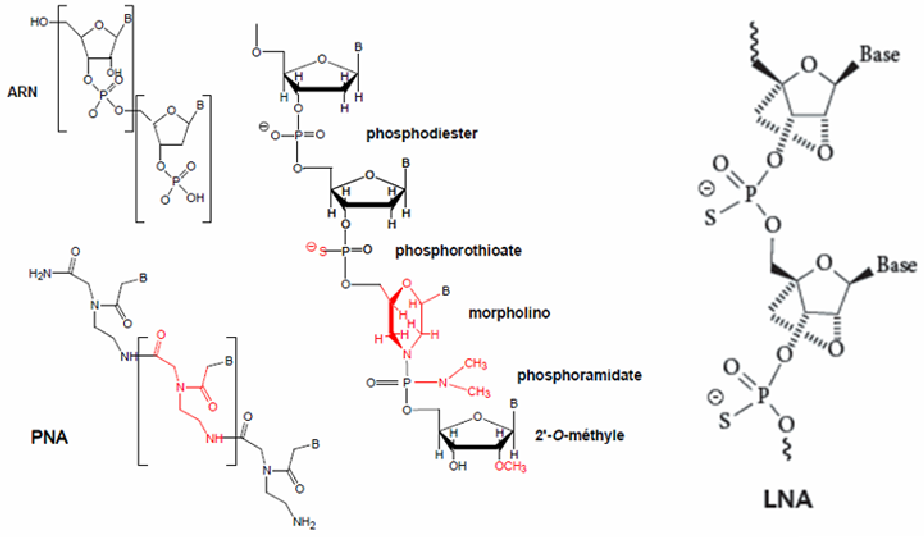


Figure 2. Modifications chimiques couramment utilisées pour augmenter la stabilité des antisens
D'après Kole et coll [4].

Actuellement, la Vitravene (formivirsen), est le seul ODN antisens approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) depuis 1998[15]. Il s'agit d'un ODN antisens phosphorothioate utilisé pour le traitement de l'infection rétinienne par le cytomégalovirus chez des patients atteints du SIDA. Ce produit a été développé par la société Isis Pharmaceuticals et est vendu par la société Novartis. Plusieurs ODN antisens ont échoué lors d'essais cliniques de phase III. L'Alicaforsen (Isis 2302) dirigé contre la protéine d'adhésion intercellulaire ICAM-1 n'a pas montré d'effets pour le traitement de la maladie de Crohn[16]. Cependant, cette molécule est testée maintenant dans le traitement de colite ulcéreuse (inflammation du colon)[17]. Le Genasense (G3139) (Berkeley Heights), un ODN antisens composé de 18 désoxyribonucléotides phosphorothioates s'hybridant avec les 6 premiers codons de l'ARN-m codant pour la protéine Bcl-2 formant un duplexe ADN/ARN qui inhibe

la traduction de la protéine[18], n'a pas montré d'effets bénéfiques sur le mélanome métastatique[19]. Il a également été testé en essai clinique de phase II/III sur d'autres types de cancer (lymphome non Hodgkinien, leucémie lymphocytaire chronique, mélanome malin, myélomes multiples) où des résultats prometteurs ont été obtenus[20–22]. En 2009, la FDA n'a pas approuvé l'utilisation de cette molécule pour le traitement de la leucémie lymphocytaire chronique, de nouveaux tests cliniques s'avérant nécessaires (drugs.com/nda/genasense_090309.htm). L'Affinitac (aprinocarsen sodium) (Isis 3521), un ODN antisens composé de 20 oligodéoxynucléotides s'hybridant avec l'ARN-m de la phosphokinase PKC-α[23] n'a pas montré d'effets en étude clinique de phase III pour le traitement contre le carcinome pulmonaire à petites cellules (non-small-cell-lung carcinoma)[24]. Un ODN antisens de 13 thio-phosphoramidate déoxynucléotides ciblant l'ARN-m de la télomérase a aussi été étudié[25]. Actuellement, les oligonucléotides ARN antisens 2'-O-méthyles, phosphorothioates et morpholinos sont utilisés en clinique dans la stratégie du saut d'exon pour corriger un exon défectueux au niveau de l'ARN-m de la dystrophine, protéine responsable de la myopathie de Duchenne[26].

2) Les ribozymes

Les ribozymes sont des ARN catalytiques comportant une partie antisens pour reconnaître la séquence ARN cible d'un ARN-m et une partie catalytique permettant de couper cette séquence cible à un site spécifique (Figure 3). L'avantage de cette technologie est la spécificité du clivage qui ne conduit pas à la destruction du ribozyme laissant la possibilité de se fixer sur un autre ARN-m et ainsi de réaliser pour une même molécule de multiples cycles catalytiques. Les inconvénients proviennent d'une stabilité et d'une délivrance trop faible du ribozyme. De plus, il n'est pas possible d'utiliser des oligonucléotides modifiés chimiquement car ils perdent leur activité catalytique[3]. Quelques ribozymes sont toutefois en cours d'essais cliniques. L'Heptazyme, qui est dirigé contre le virus de l'hépatite C induit 90% d'inhibition de la réplication virale sur des cellules en culture[27]. Des résultats prometteurs ont été obtenus en phase I et II mais la toxicité trop importante de ce produit a conduit à l'arrêt des essais[28]. L'Herzyme est un ribozyme dirigé contre le facteur 2 de croissance épidermique humain qui est surexprimé dans certains cancers ovariens et pulmonaires. Il a été testé en essai clinique de phase I[29].

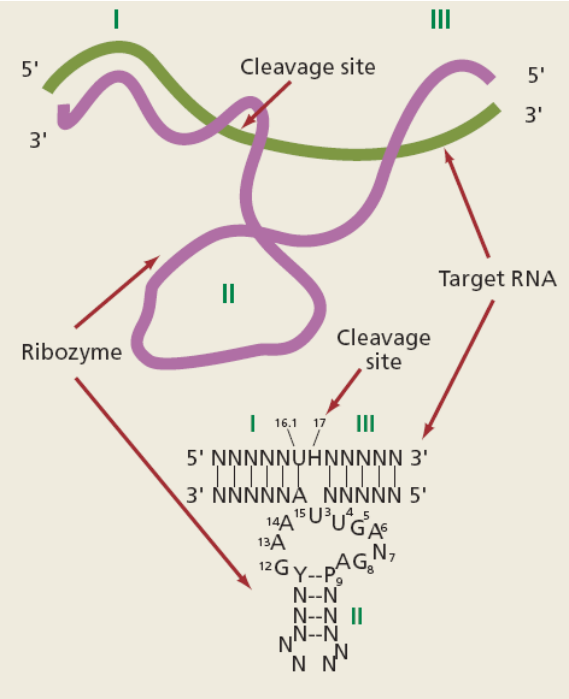


Figure 3. Schéma de fonctionnement d'un ribozyme sur un ARN cible.
D'après Scherer et Rossi[30]

3) ARN interférents

Les ARN interférents (ARNi) sont des ODN d'ARN double brin conduisant à une inhibition spécifique de la cible par dégradation de l'ARN-m correspondant ou par blocage de la traduction[31] (Figure 4).

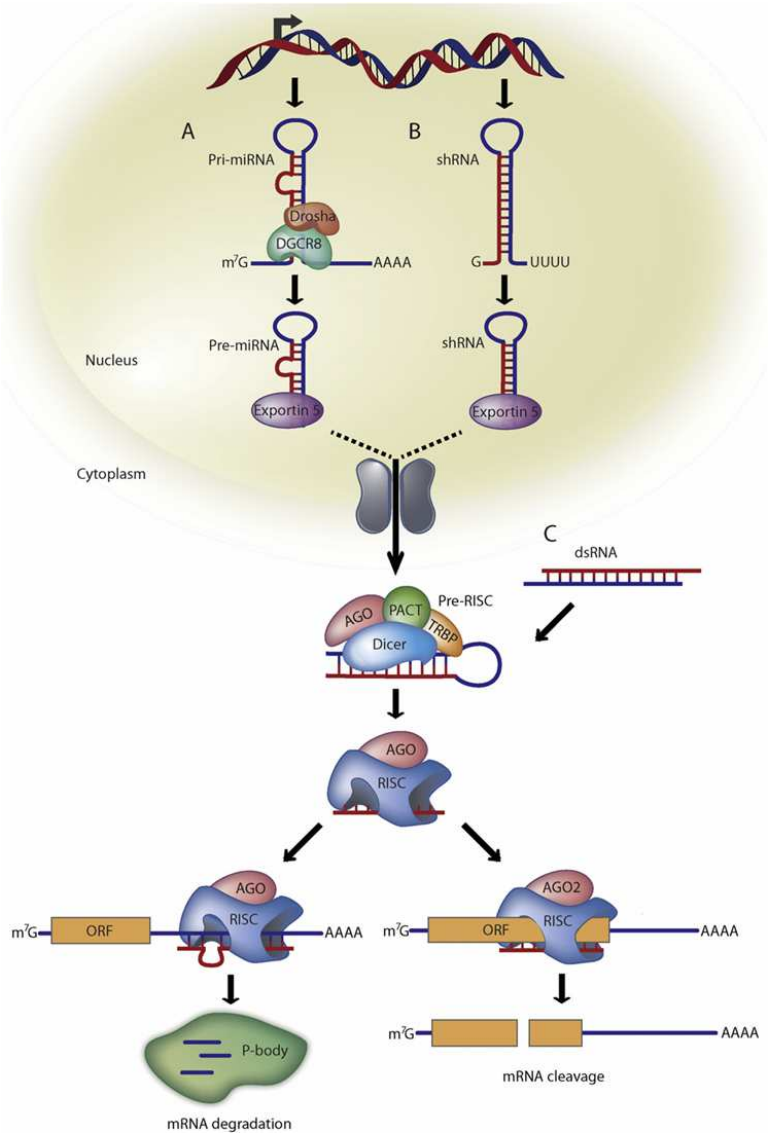


Figure 4. Schéma de fonctionnement des ARN interférents.
D'après Burnett et Rossi[32]
A. Les miRNA sont transcrits à partir d'ADN comme miRNA primaires (pri-miRNA) puis processés par Drosha etDGCR8 en précurseur mi-RNA (pre-miRNA) ayant la forme d'une tige-boucle de 70 nucléotides. Le pre-miRNA est transporté dans le cytoplasme par des exportines à ARN double brin puis est processé par le complexe Dicer/TRBP en un duplexe de 22 nucléotides. Le duplexe miRNA s'associe avec la protéine AGO et RISC, où un brin est enlevé. Le complexe RISC avec le brin restant va s'hybrider avec un ARN-m cible. L'inhibition de l'expression génique est réalisée en inhibant l'initiation de la traduction ou en transportant le complexe dans les p-bodies (processing bodies) où l'ARN-m est détruit.
B. Comme les miRNA, les shRNA sont transcrits à partir d'ADN et suivent le même processus de traitement.
C. Contrairement au shRNA, les siRNA sont introduits de façon artificielle dans le cytoplasme.

Pour introduire un ARNi dans la cellule, on utilise un ODN d'ARN double brin appelé siRNA (short interfering RNA) de 21-23 pb avec les extrémités 3' allongées de 2 bases. Un siRNA peut être produit *in situ* par transfert de gène. Codant un shRNA, le précurseur du siRNA double brin avec une boucle hairpin sera processé par Dicer puis RISC. Parmi les inconvénients, les siRNA ont parfois des effets non spécifiques, les différents mécanismes responsables de la non spécificité des siRNA sont décrits par Jackson et Linsley[33]. Notons également qu'il a été montré que les effets non spécifiques dépendent fortement du vecteur utilisé pour les introduire dans les cellules[34–36]. Il a été montré qu'un ARN double brin interagissait avec les récepteurs Toll-like 3 (TLR3), récepteurs de la réponse immune innée, conduisant à l'activation de NF-κB[37]. Les siRNA sont aussi sensibles aux nucléases et présentent donc une faible stabilité. Certaines études ont utilisé des siRNA non modifiés en thérapie[38]. Cependant, d'autres études ont utilisé des siRNA modifiés afin d'augmenter la stabilité des duplexes, la résistance aux RNAses, la spécificité pour cibler les ARN-m et réduire les effets non spécifiques[39]. D'autres études encore utilisent des vecteurs pour protéger les siRNA et augmenter l'internalisation dans les cellules[40–42].

Des essais cliniques sont en cours pour le traitement d'infections virales, de cancers, de maladies oculaires et des essais en phase I pour des maladies neurodégénératives, des allergies et des maladies inflammatoires[43]. Actuellement, le siRNA médicament le plus avancé est ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals) dirigé contre l'ARN-m du virus respiratoire syncytial[44]. L'ICS-283 (Intradigm), combinaison de 2 siRNA ciblant les ARN-m du VEGF et du VEGFR2, est en essai clinique. Le Bevasiranib, combinaison de 2 siRNA ciblant les ARN-m du VEGF et du VEGFR1 est en essai clinique de phase II/III[45].

I-B) Acides nucléiques ciblant l'ADN

L'interaction d'un ODN sb avec un gène conduisant au blocage du processus de transcription induit de façon indirecte l'inhibition de la protéine.

1) Le DNAzyme

Les DNAzymes sont comparables aux ribozymes. Ce sont des ADN sb catalytiques[46]. Il a été montré qu'un DNAzyme comprenant des nucléotides fermés (LNA) bloque la réplication du papilloma virus dans les cellules. Cette molécule pourrait être candidate pour un traitement contre le cancer cervical du col de l'utérus[47].

2) Oligonucléotides formant une triple hélice

Ces ODN ADN sb se lient spécifiquement dans le grand sillon de l'ADN double brin au niveau de séquences cibles, avec la formation d'une triple hélice locale. Le mode de reconnaissance moléculaire des purines du deuxième brin par des bases appartenant au troisième brin via deux liaisons hydrogène de type Hoogsteen (Figure 5) implique que la formation de triples hélices est limitée à des séquences cibles de type oligopurine.oligopyrimidine[48]. Les ODN formants des triples hélices ont été utilisés pour inhiber l'expression de gènes ou niveau de l'ADN ainsi que pour induire la mutagénèse dirigée dans des systèmes modèles[49]. La formation d'une triple hélice conduit à l'inhibition de la transcription de l'ADN en ARN-m et donc à l'absence de production de la protéine correspondante.

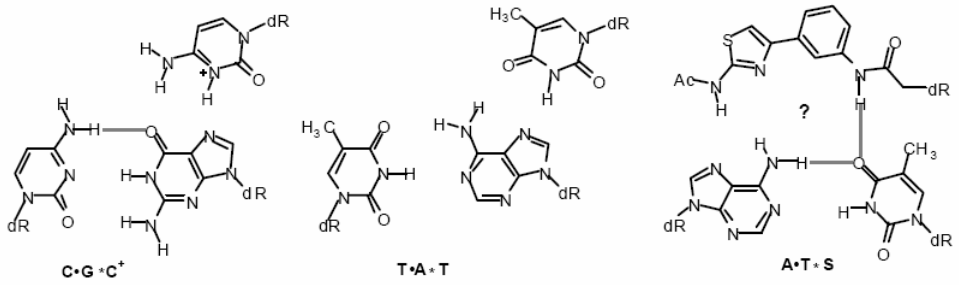


Figure 5. Schéma représentant les liaisons hydrogènes entre bases de l'ADN permettant la formation d'une triple hélice
D'après Guianvrac'h et Benhida[48]

I-C) Acides nucléiques fixant des protéines

Certains acides nucléiques ont la possibilité de fixer directement des protéines. On distingue 2 catégories : les aptamères, qui correspondent à des molécules qui adoptent une structure tridimensionnelle autorisant la reconnaissance d'une protéine ciblée et les leurres moléculaires qui possèdent une séquence de fixation prédéfinie d'un facteur de transcription.

1) Aptamères

Un aptamère est un ODN en simple brin ADN ou ARN d'environ 5 à 50 bases, qui adoptent une structure secondaire ou tertiaire et qui va se lier avec une haute affinité et une grande spécificité (10^{-12} M $<K_D<10^{-9}$ M) à des protéines[3,50]. Les aptamères sont généralement sélectionnés en étudiant l'interaction de la cible protéique avec une librairie d'oligonucléotides. Il s'agit du processus SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)[51] (Figure 6). Une librairie d'aptamères est incubée avec la cible protéique. La protéine se lie à l'aptamère qui est le plus spécifique. La séquence de l'aptamère est alors amplifiée par PCR ou RT-PCR. Le processus SELEX a aussi été décliné avec une approche cellulaire, ce qui a permis d'identifier de nouveaux aptamères se fixant sur un type cellulaire spécifique[52,53]. Afin d'optimiser les paramètres pharmacocinétiques des aptamères, des modifications chimiques sont effectuées. Les modifications les plus courantes sont l'utilisation de groupements phosphorothioates, de groupements 2'-O-méthyle ou d'acides nucléiques fermés (LNA) qui permettent d'augmenter la résistance aux nucléases[54,55]. Il a également été observé que la demi-vie des aptamères dans l'organisme est très faible, leur petite taille étant responsable de leur élimination de l'organisme par clairance rénale. Afin d'augmenter leur demi-vie, ils sont souvent couplés à une molécule de polyéthylène glycol (PEG) qui augmente leur taille[56,57]. Plusieurs types d'aptamères existent selon leur fonctionnalité, leur cible ou leur forme.

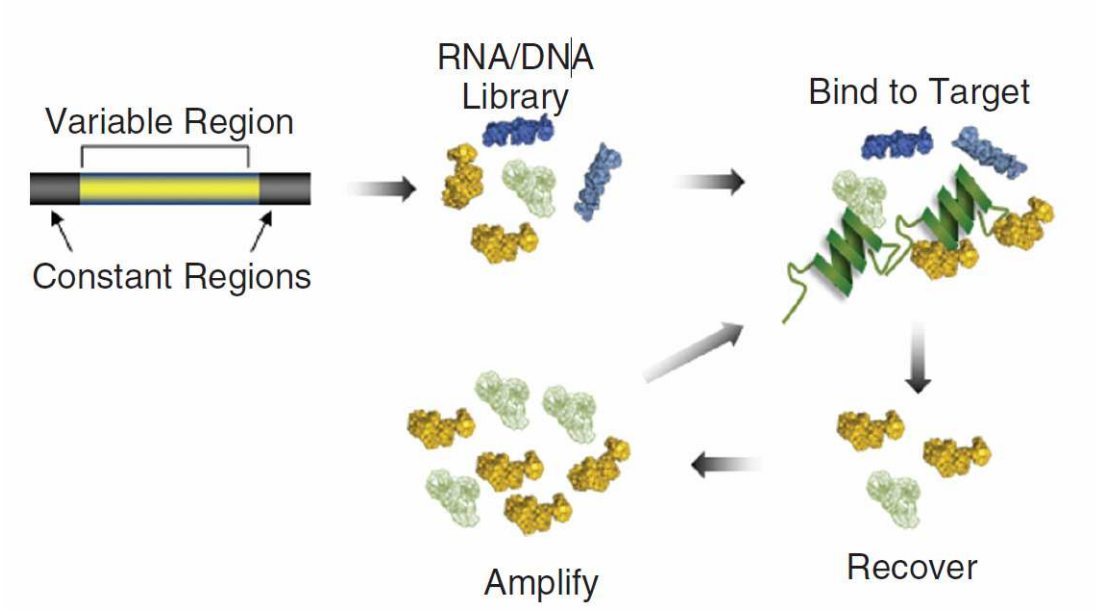


Figure 6. Schéma de la technologie SELEX
D'après Thiel et Giangrande[58]

a) Les aptamères extracellulaires

Ces aptamères ne pénètrent pas dans les cellules. Leurs cibles sont soit des récepteurs extracellulaires ou des protéines circulantes. Le pegaptanib, qui est un aptamère ARN de 28 bases se lie au VEGF extracellulaire en particulier l'isoforme de 165 acides aminés ($VEGF_{165}$) et bloque son activité. C'est le seul aptamère approuvé par la FDA en 2004[59,60]. Il est utilisé pour traiter les patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Afin d'améliorer sa stabilité, il a été modifié chimiquement avec des 2'-fluoropyrimidines, des 2'-O-Me purines et du PEG[61]. Le NU172 (Nuvelo/Archemix), un aptamère ADN spécifique de la thrombine, a été évalué en essai clinique de phase I et un essai de phase II est planifié en 2013 (clinicaltrials.gov : NCT00808964).

b) Les aptamères « decoy-like »

Ces aptamères ont la même fonction qu'un leurre moléculaire d'ADN double brin puisqu'ils sont dirigés contre une protéine de reconnaissance de l'ADN comme un facteur de transcription ; plusieurs aptamères ADN ou ARN ont été obtenus contre le facteur de transcription NF-kB[62,63]. Pour le moment ces aptamères n'ont pas été testés en clinique pour plusieurs raisons. D'abord ayant une fonction intracellulaire, ils doivent être stables et avoir une bonne délivrance intracellulaire. Le risque important de perdre la capacité de

reconnaissance de la cible pour un aptamère est forte du fait de sa structure tertiaire ; par conséquent des modifications chimiques de l'apatmère sont difficiles. De plus, il a été montré qu'un aptamère ARN en interaction avec la protéine cible NF-κB $(p50)_2$ avait conduit à sélectionner les mêmes interactions acides nucléiques-protéines[64] que dans un complexe formé entre la séquence d'ADN double brin kB naturelle et cette protéine. De ce fait, il n'y pas avantage notamment en terme d'affinité à choisir une stratégie aptamère basée sur une méthodologie de sélection et d'enrichissement long et difficile.

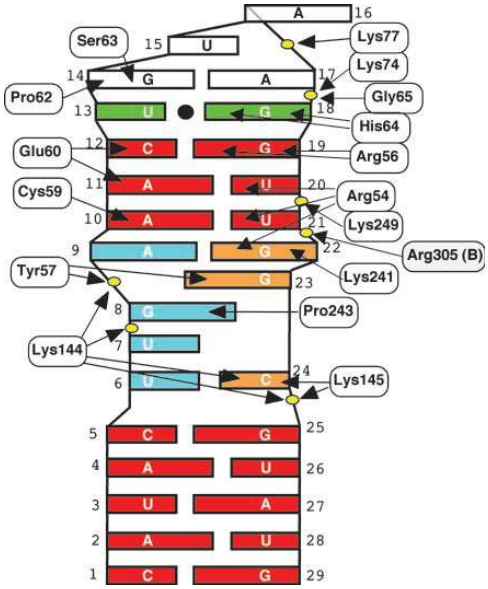


Figure 7. Repliement de l'aptamère ARN dirigé contre NF-κB (p50)2 montrant la formation d'appariements sous forme de double hélice avec des interactions acides nucléiques/protéine similaires à celles rencontrées avec l'ADN et NF-κB (site κB/NF-κB).
D'après Huang et coll[64]

c) Les quadruplexes

Les « G-Quartet » intramoléculaires correspondent à l'association de 4 résidus guanine qui s'arrangent en plateaux pour conduire à la formation de structure en quadruplexe. Ces structures existent naturellement dans des régons riches en guanines (séquences télomériques, promoteurs de certains gènes) et seraient impliqués dans des régulations. Des quadruplexes ont été utilisés comme molécules anticancéreuses pour inhiber le facteur de transcription Stat3[65].

Le T40214 et le T40231 sont des oligodeoxynucléotides en « G-Quartets » qui ont été développés pour inhiber Stat3 et les gènes sous la dépendance de Stat3[66]. Par bioinformatique, les auteurs ont proposé que ces molécules déstabilisent l'homodimérisation de Stat3 en s'insérant entre les 2 domaines SH2. Les auteurs ont montré par la suite[65] que ces molécules inhibent Stat3 dans des cellules HNSCC et augmentent l'apoptose. *In vivo*, il a été montré que ces molécules suppriment la croissance de tumeurs HNSCC xénogreffées dans des souris nude.

Le AS1411 (Antisoma) est un quadruplexe de 26 bases riches en résidus guanine qui se lie à la nucléoline. Cette molécule a été évaluée avec succès en essai clinique de phase II sur 30 patients atteints de carcinomes du rein à un stade avancé. Aucune toxicité importante n'a été observée[67,68].

d) Les aptamères peptidiques

Une autre classe d'aptamères a été développée : ces aptamères ne sont pas constitués d'acides nucléiques mais de 12 à 20 acides aminés. Récemment, le rS3-PA, un aptamère peptidique de 20 acides aminés ciblant Stat3 a été mis au point. Il a été modifié de sorte à posséder un signal de localisation nucléaire et est fusionné avec le PTD, une petite séquence peptidique cationique qui permet d'accroître l'internalisation cellulaire. Cette molécule fonctionne en interagissant avec le domaine de dimérisation de Stat3. Les auteurs rapportent que cette molécule permet l'inhibition de la croissance tumorale dans une souris xénogreffée avec un glioblastome[69].

2) ADN leurres moléculaires

Les ODN leurres moléculaires (OLM) sont de petites séquences d'ADN en double brin comportant une séquence reconnue par une protéine comme un facteur de transcription le plus souvent. Dans une cellule, l'interaction entre l'OLM et un facteur de transcription cible fait que le facteur de transcription ne peut plus reconnaître sa séquence cible au niveau génomique (généralement, dans le promoteur d'un gène). Ceci aboutit à l'inhibition de l'activité du facteur de transcription et des gènes sous sa dépendance (Figure 8). En 1990, l'équipe de Nabel est la première à suggérer que les leurres peuvent être utilisés pour étudier le rôle des facteurs de transcription dans la cellule[70] en proposant que l'altération de la

transcription de gènes par l'inhibition des protéines responsables de la régulation de la transcription permettra de déterminer le fonctionnement de ces facteurs ; ils ont aussi déterminé que l'inhibition des protéines qui se lient de façon séquence spécifique à l'ADN peut être réalisée avec des oligodésoxynucléotides phosphorothioates double brin. Lors de cette étude, l'utilisation d'un oligodésoxynucléotide phosphorothioate transfecté dans une lignée de cellules B a permis l'inhibition de l'activation du facteur NF-κB induite par l'enhancer du virus VIH. En 1995, l'équipe de Dzau est la première à suggérer que ces leurres peuvent être utilisés comme outils pour manipuler à des fins thérapeutiques l'expression génique[71]. Lors de cette étude, la transfection d'un OLM fixant E2F a permis l'inhibition de l'expression de l'oncogène c-Myc, de la cycline cdc2 et l'inhibition de la prolifération cellulaire de cellules VSMC (cellules musculaires lisses des vaisseaux) de rat aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

La stratégie du leurre moléculaire présente de nombreux avantages[72]. Dans le cas d'un facteur de transcription, la cible potentielle est facilement adaptable à condition de connaître la séquence consensus de reconnaissance. La synthèse de l'OLM est relativement simple. La connaissance de la structure du facteur de transcription cible n'est pas nécessaire.

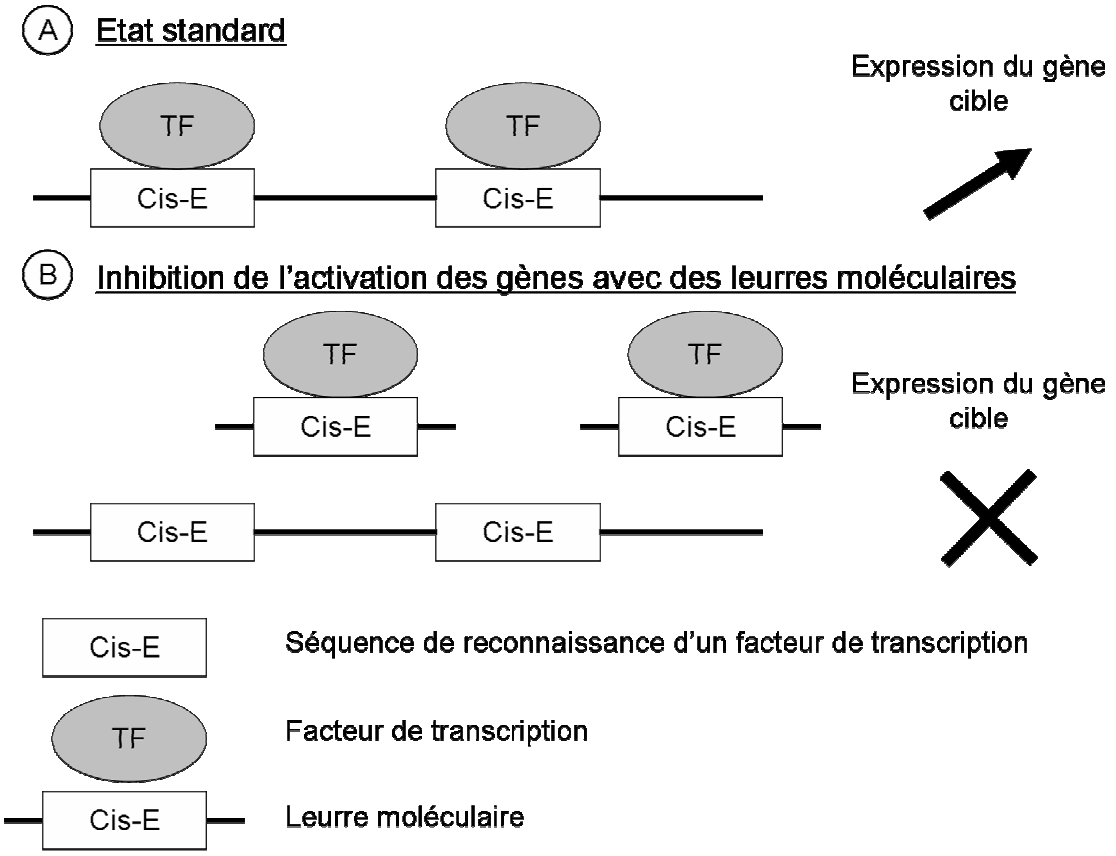


Figure 8. Schéma de fonctionnement de la stratégie du leurre moléculaire
D'après Morishita R et coll.[73]

A) ODN leurres moléculaires ciblant une seule protéine

Comme les autres stratégies utilisant des acides nucléiques, les OLM sont sensibles à la dégradation par des nucléases. On distingue 3 types d'OLM. (Figure 9)

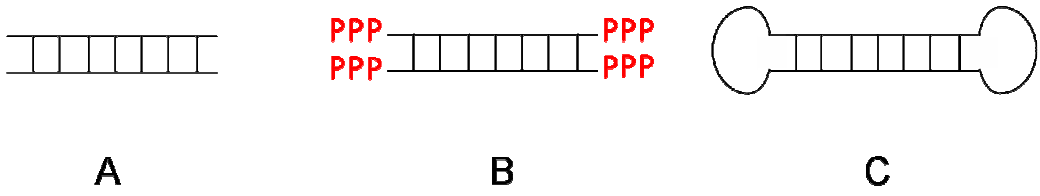


Figure 9. Différents types de leurres moléculaires.
En A, OLM non modifié. En B, OLM modifié chimiquement. En C, ODN de type « dumbbell » (forme d'haltère).

OLM non modifiés

Ces leurres correspondent à des duplexes d'ADN d'environ 20 paires de base et qui n'ont pas subi de modifications chimiques (série phosphodiester). Ils contiennent une séquence de liaison au facteur de transcription ciblé qui interagit de manière hautement spécifique[74]. Ces leurres ont néanmoins l'inconvénient d'être rapidement dégradés par les nucléases. Ainsi, pour augmenter leur effet thérapeutique, des modifications chimiques des oligodésoxyribonucléotides ont éré réalisées pour augmenter la stabilité des leurres dans les fluides biologiques

OLM modifiés chimiquement

La principale modification chimique qui a été réalisée est le remplacement des groupements phosphodiesters par des groupements phosphorothioates. Le premier leurre utilisé en thérapie, est l'édifoligide ciblant le facteur de transcription E2F[71]. Une autre modification correspond à l'incorporation d'acides nucléiques fermés (LNA) dans la séquence oligonucléotidique. Cependant, il a été montré que ces modifications étaient responsables d'une diminution de l'affinité de la protéine pour le site de liaison et induisaient une toxicité[75,76]. *In vivo*, il a été rapporté des effets secondaires lors de l'utilisation de quantités modérées à importantes d'OLM phosphorothioates[77]. Pour contrer ces effets induits par des

modifications chimiques, la protection des extrémités d'un OLM par un autre système a été réalisée en développant les OLM « dumbbells ».

Oligonucleotide type	Structure	Relative stability in serum	Relative stability of the NFκB-oligonucleotide complex	References
Phosphodiester		Very low	Good	A
Phosphorothioate		Low	Good	B
Peptide nucleic acid (PNA)		Good	Very low	C
Locked nucleic acid (LNA)		Good	Very low	D

B Base

Figure 10. Caractéristiques des oligonucléotides modifiés chimiquement utilisés dans la stratégie du leurre moléculaire
D'après De Stefano et coll[77]
Références : A : [78–80]; B : [81–83] ; C : [78–80] ; D : [84]

Les OLM en forme d'haltère « dumbbells »

Les OLM « dumbbells » (forme d'haltère) sont constitués d'un duplexe d'ADN d'environ 20 paires de base comprenant la séquence de liaison au facteur de transcription et de 2 boucles simple brin, de sorte qu'une boucle soit présente à chaque extrémité du duplexe pour former une liaison 3'-5' sans extrémité libre. Il a été montré que ces OLM ont une stabilité accrue par rapport aux OLM phosphodiesters[85]. Dans le cas d'un leurre ciblant NF-κB, une activité similaire a été reportée entre un OLM « dumbell » et un OLM de type phosphorothioate pour la liaison avec le facteur de transcription[85].

i) Mécanisme de la stratégie du leurre moléculaire

Les OLM, étant sous forme de double hélice d'ADN chargée négativement, et bien qu'ayant une taille restreinte, sont confrontés aux problèmes de pénétration intracellulaire (passage de la membrance cellulaire chargée négativement) et de compartimentalisation

intracellulaire (piégeage et dégradation par les endosomes) ce qui limite leur libération dans le cytosol. La délivrance et la localisation intracellulaire d'un OLM au sein d'une cellule sont déterminées respectivement par la cytométrie en flux et par la microscopie confocale. La cytométrie en flux est quantitative mais nécessite d'utiliser un OLM marqué par un fluorophore ce qui peut moduler ses propriétés intracellulaires. La microscopie confocale est assez facile à mettre en œuvre mais elle ne permet pas de quantification et nécessite un marquage de l'OLM par un fluorophore. Ces techniques bien qu'ayant chacune leurs limites sont les plus utilisées alors que d'autres techniques plus difficiles à mettre en œuvre existent. Notamment, la quantification d'un ODN peut être réalisée à partir d'extraits nucléaires et cytoplasmiques par PCR quantitative, par HPLC et par une technique d'hybridation sur microplaque avec un OLM biotinylé et enfin par marquage radioactif.

De nombreuses équipes ont étudié le mode d'action des OLM dans la cellule. La localisation cytoplasmique et/ou nucléaire d'un OLM constitue un point primordial qu'il est nécessaire de connaître afin de comprendre comment les facteurs de transcription sont inhibés. Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont été réalisées sur la localisation d'un OLM au sein de la cellule par microscopie mais aucun bilan systématique n'a été réalisé. Dans la suite, nous avons cherché à classer ces études en fonction de plusieurs paramètres afin de mieux comprendre le fonctionnement d'un OLM. Notamment, nous avons cherché à connaître la localisation des OLM en fonction du moyen de délivrance intracellulaire (vecteur).

Dans plusieurs études, la délivrance intracellulaire de l'OLM est réalisée sans système de vectorisation (OLM nu). En 2003, l'équipe de Grandis[86] transfecte un OLM marqué à la cyanine 3 et ciblant Stat3 dans des cellules SCCHN (cellules cancer tête et cou) et observe qu'après 6h de transfection, le leurre est localisé dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules. De la même façon, en 2009, l'équipe de Ishuguro[87] montre après transfection d'1 µM de leurre linéaire phosphorothioate marqué à la fluorescéine et ciblant NF-κB dans les cellules HOS et MG-63 (lignées cellulaires d'un ostéosarcome humain) qu'après 8h d'incubation, les leurres sont localisés aussi bien au niveau nucléaire qu'au niveau cytoplasmique. En 2011, l'équipe de Hashida[88] observe de la même façon (transfection pendant 6h de 2 µM de leurres linéaires phosphodiesters marqués à la rhodamine et ciblant NF-κB) dans une culture primaire de macrophages une localisation nucléaire des leurres moléculaires. Néanmoins, en 2006, l'équipe de Ivanovskaya[89] rapporte une localisation des leurres linéaires phosphorothioates

ciblant NF-κB au niveau cytoplasmique dans des cellules humaines HCT-116 (colon). Néanmoins, lorsqu'un traitement au TNF-α est réalisé, les leurres sont localisés au niveau nucléaire. En 2008, l'équipe de Fattal[90] observe une faible fluorescence dans le cytoplasme des cellules de macrophages RAW 264,7 après 4 heures de transfection avec 0,4 µM d'OLM phosphorothioate marqué à la rhodamine et ciblant NF-κB. *In vivo*, en 2002, l'équipe d'Alton[91] ayant administré à des souris par la cavité nasale 80 ou 500 µg d'OLM phosphorothioate ciblant NF-κB à des souris rapporte que le leurre est localisé dans le cytoplasme des cellules pulmonaires et conclut que l'accès des oligonucléotides au noyau des cellules épithéliales pulmonaires est un problème majeur, limitant l'efficacité de la stratégie du leurre moléculaire. Plusieurs études concluent donc au passage intranucléaire d'un OLM en absence de vecteur. Cependant d'autres paramètres comme peut être la lignée cellulaire ou les conditions de délivrance peuvent limiter ce passage. Par ailleurs, les quantités d'OLM utilisées dans ces conditions sont importantes ce qui peut poser un problème de cout pour des applications thérapeutiques. De nombreuses études se sont donc orientées vers la vectorisation des OLM.

La majorité des équipes utilisent donc un vecteur pour permettre une meilleure internalisation dans les cellules d'un OLM, principalement des polymères cationiques ou des liposomes cationiques. Ces vecteurs forment des complexes avec l'acide nucléique qui correspondent à des particules de taille nanométrique (Tableau 1). Le trafic intracellulaire de nanoparticules d'ADN plasmidique a été décrit par notre équipe[92]. De manière générale, les nanoparticules d'ADN sont internalisées majoritairement par la voie d'endocytose dépendante de vésicules à clathrine, bien que selon le vecteur utilisé et le type de cellules, d'autres voies d'internalisation sont utilisées, en particulier celles utilisant les vésicules de type cavéoles (voie cavéolaire). Après endocytose, les nanoparticules sont présentes dans les endosomes. Afin que l'ADN internalisé ne soit pas dégradé, les nanoparticules doivent permettre une sortie des endosomes avant que ces derniers ne fusionnent avec les lysosomes. Après échappement des endosomes, les nanoparticules (l'ADN avec ou sans le vecteur) sont localisées dans le cytosol. Dans le cas d'un ADN plasmidique codant un gène, celui-ci doit être transféré dans le noyau pour permettre l'expression du gène. Dans le cas d'un leurre moléculaire, la destination finale devrait également être le noyau puisque les facteurs de transcription agissent principalement au niveau nucléaire.

La grande majorité des vecteurs utilisés pour la transfection des OLM sont des liposomes. Depuis ces dix dernières années, des recherches sont menées afin de connaître la localisation intracellulaire d'OLM ainsi vectorisés dans les cellules. L'équipe de Dzau[93], en utilisant un liposome cationique avec 2 µM d'un OLM phosphorothioate de 14 pb marqué avec la fluorescéine et ciblant le facteur de transcription E2F trouve une localisation du leurre dans des cellules mésangiales, après 6,12 et 24 heures de transfection à la fois dans le cytoplasme et le noyau. 24h après transfection, ils observent que le leurre est détecté dans le noyau de 60 % des cellules. Cette étude précise également qu'en l'absence de liposome cationique, les leurres ne sont pas internalisés de façon significative par ces cellules. En 2007, l'équipe de Tian[94] transfecte des cellules A549 avec 50, 25 et 12,5 nM de leurres phosphorothioates marqués au FITC ciblant Stat3 complexés avec la lipofectamine 2000. Après 6h de transfection, une localisation nucléaire des leurres est observée. Si ces études tendent à montrer une localisation nucléaire des leurres vectorisés avec un lipide, un grand nombre d'autres études observent un résultat différent.

En 2002, l'équipe d'Alton[91] en administrant à des souris 80 ou 500 µg de leurres ciblant NF-κB complexés au lipide cationique GL67 rapporte une localisation cytoplasmique des leurres dans les cellules pulmonaires. L'équipe de Fattal[90], en utilisant 0,4 µM de leurres phosphorothioates marqués à la rhodamine et ciblant NF-κB complexés avec des liposomes composés de différents groupements fonctionnalisant permettant une meilleure internalisation cellulaire observe une localisation exclusivement cytoplasmique des leurres. L'équipe du Pr. Rémi Fagard transfecte des leurres moléculaires à l'aide d'un liposome cationique contenant du DOPE dans des cellules MCF7 et SW480 et rapporte que le leurre est localisé dans le cytoplasme de la cellule[95–97]. De plus, ils montrent que le leurre retient la sous-unité p50 de NFκB exclusivement dans l'aire périnucléaire du cytoplasme. La localisation intracellulaire de leurres moléculaires ciblant Stat3 a également été recherchée dans des cellules SW480 en 2009[96]. Si Stat3 est localisé dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules SW480 en absence de leurre, Stat 3 est colocalisé avec le leurre exclusivement au niveau cytoplasmique des cellules transfectées. Il est intéressant de noter que quand le leurre est non spécifique, Stat3 est localisé au niveau nucléaire et cytoplasmique et le leurre non spécifique localisé au niveau cytoplasmique. De façon plus précise, l'équipe montre que Stat3 non phosphorylé est localisé au niveau cytoplasmique tandis que Stat3 phosphorylé est localisé au niveau nucléaire[97]. En présence d'un leurre non spécifique, une localisation nucléaire de Stat3 et cytoplasmique du leurre est observée. Ces résultats montrent que l'inhibition de Stat3 par un

leurre implique le piégeage de Stat3 activé dans le cytoplasme. Ainsi, ces 3 études tendent à montrer une localisation cytoplasmique des leurres vectorisés à l'aide de liposomes cationiques et un fonctionnement des leurres dû à une rétention de la cible dans le cytoplasme. L'équipe de Hashida a utilisé des liposomes cationiques mannosylés pour transfecter des leurres ciblant NF-κB dans des macrophages[88,98]. Dans une première publication[98], l'administration à des rats par voie trachéale de 50 µg de leurres phosphorothioates marqués avec une fluorescéine et complexés avec les liposomes mannosylés montre une localisation des leurres principalement au niveau cytoplasmique avec une petite quantité dans le noyau des macrophages alvéolaires. Des résultats identiques sont obtenus avec 2 µM de leurres linéaires phosphodiesters ciblant NF-κB marqués à la rhodamine transfectés pendant 6h dans une culture primaire de macrophages[88]. Dans les 2 cas, les auteurs observent une suppression de l'activation de NF-κB dans les cellules, venant renforcer l'hypothèse que des leurres moléculaires fonctionneraient en provoquant la rétention de la cible au sein du cytoplasme.

Si les liposomes cationiques ont été fréquemment utilisés pour vectoriser des leurres, d'autres composés ont également fait l'objet d'études. Des polymères cationiques, molécules couramment utilisées pour la délivrance de plasmide, ont été complexés avec des OLM, et la localisation intracellulaire a été déterminée par immunofluorescence ou par observation directe à l'aide d'un fluorophore greffé sur un OLM. Ainsi, avec des complexes entre un OLM ciblant NF-κB marqué au Texas red et un polymère PLL-g-HA [copolymère branché de hyaluronate et de poly(L-lysine)], les leurres sont principalement observés après 24h dans le cytoplasme et autour du noyau de cellules humaines LES (cellules endothéliales du foie)[99]. Dans ces expériences, la protéine p65 de NF-κB a été observée par immunofluorescence dans les cellules. En présence de TNF-α, elle est localisée dans le noyau mais en présence du leurre ciblant NF-κB, elle reste dans le cytoplasme. Les auteurs concluent par conséquent qu'un leurre couplé au copolymère PLL-g-HA est capable d'être délivré dans le cytosol et qu'il agit par rétention de la cible NF-κB dans le cytoplasme. Un autre polymère cationique, le polyéthylénéimine (PEI) a été utilisé pour vectoriser des leurres ciblant NF-κB dans des cellules endothéliales de cerveau de souris bEnd5[100]. Il s'agit d'une petite PEI branchée de 2,7 kDa. Sur les complexes leurres/PEI a été absorbé soit de la transférine, soit un anticorps anti-récepteur de la transférine afin de favoriser l'internalisation sélective par endocytose de ces complexes. Avec les leurres marqués avec la fluorescéine et la PEI marquée avec la rhodamine, il a été possible de montrer par observation directe sur cellules fixées que les complexes sont localisés dans les vésicules d'endocytose après internalisation et que ces

complexes restaient stables. Concernant la fonctionnalité des leurres, les auteurs montrent que les complexes leurre/PEI/anticorps anti récepteur à transférine permettent l'inhibition des gènes sous la dépendance de NF-κB. Cependant, seule l'utilisation d'une concentration de 0,5 µM de leurre ciblant NF-κB permet l'inhibition de l'adhésion des monocytes à une monocouche de cellules bEnd5, une concentration plus élevée étant inefficace. En 2004, l'équipe de Chambers[101] mène une étude cherchant à déterminer la localisation intracellulaire de leurres ciblant AP-1 dans 3 lignées cellulaires différentes (KB-3, CHO, MDA-MB-231) et en utilisant plusieurs types de vecteurs de transfection : deux lipides (l'oligofectamine et le Transfectin Lipid Reagent), un dendrimère (le Polyfect) et une formulation non liposomale (le Fugène 6). La transfection des cellules est réalisée avec un OLM à une concentration de 100 nM. Les transfections menées avec l'oligofectamine montrent que le leurre est localisé au niveau périnucléaire, et ce, 12h et 48h après la fin de la transfection. Les auteurs rapportent que l'utilisation du Fugène 6 n'a pas permis d'internaliser les leurres. Les autres vecteurs ont permis une internalisation, mais qui serait moins efficace qu'avec l'oligofectamine. La localisation intracellulaire observée est cytoplasmique. Les auteurs concluent que ces résultats sont identiques sur les 3 lignées cellulaires testées, ceci suggérant que la localisation cytoplasmique des leurres n'est pas un phénomène cellule spécifique. Se référant à la publication de l'équipe d'Alton[91] qui montre une localisation cytoplasmique des leurres NF-κB, les auteurs suggèrent également que la localisation cytoplasmique des leurres n'est pas séquence spécifique du leurre.

Des nanoparticules d'acide polylactique (PLA) ont également été utilisées pour transférer des leurres ciblant NF-κB dans des cellules endothéliales BMEC[102,103]. Une localisation cytoplasmique des leurres a également été observée. Le vecteur (HVJ)-Liposome (Hemagglutinating virus of Japan)[104] qui combine les avantages des vecteurs viraux (meilleurs taux de transfection que les vecteurs non viraux) et non viraux (utilisation simple et sécurisée) a été utilisé pour complexer des leurres ciblant NF-κB. Les leurres ont été utilisés par injection dans la veine porte d'une souris[105]. Les auteurs décrivent que le leurre est localisé essentiellement au niveau des macrophages du foie mais n'ont pas recherché la localisation intracellulaire. Ils précisent néanmoins que la sous-unité p65 de NF-κB dans les cellules non parenchymateuses est également retenue dans le cytoplasme. Ceci, au vu des études citées précédemment, suggère également une localisation cytoplasmique du leurre et un fonctionnement cytoplasmique. Plus récemment, l'équipe de Kawashima[106] a utilisé des particules de PLGA [poly(D,L-lactide-co-glycolide)] modifiés avec du chitosan. Le PLGA est

une molécule approuvée par la FDA pour certains usages cliniques chez l'homme[107]. Ce vecteur a été complexé avec des OLM phosphorothioate ciblant NF-κB et les complexes ont été transfectés dans des cellules Caco-2. Les complexes sont observés uniquement dans le cytoplasme ou en position périnucléaire. Les auteurs observent également que des complexes sont situés dans le lysosome. Ils suggèrent ainsi que ces complexes sont internalisés dans les cellules Caco-2 par voie d'endocytose.

Pour résumer, dans la majorité des études ayant utilisé un OLM à l'aide d'un vecteur lipidique ou polymérique, l'OLM a une localisation cytoplasmique. Cependant, ces études ont également montré que les leurres sont responsables d'un effet biologique par l'inhibition de gènes sous la dépendance du facteur de transcription ciblé. Ces résultats renforcent l'hypothèse que le mécanisme d'inhibition induit par le leurre consisterait en la rétention du facteur de transcription ciblé au niveau du cytoplasme de la cellule.

Certains auteurs ont développé des vecteurs destinés à permettre le transfert d'OLM dans le noyau des cellules, espérant ainsi observer une augmentation des effets biologiques. L'équipe de Huh[108] a développé un leurre ciblant p53 et a transfecté des cellules HCT116 à l'aide de la Lipofectamine 2000 ou d'une protéine de transfert. Cette protéine est constituée de GST-7GR-Ga-NLS. La GST correspond à la glutathione S-transférase. Le 7GR correspond à un fragment de 7 glycines et de 7 arginines. GA correspond au domaine de liaison à l'ADN de Gal4. Le NLS correspond au peptide signal de localisation nucléaire de l'antigène T du virus SV40. Dans cette expérience, la présence de p53 sur le promoteur p21 a été étudiée. Lorsque l'OLM est délivré avec le nouveau vecteur, une diminution de p53 est observée au niveau du promoteur, ce qui n'est pas le cas lorsque l'OLM est délivré avec la Lipofectamine 2000. Cette étude permet de mettre en avant la corrélation entre l'activité et la localisation du facteur de transcription en fonction du compartiment où se trouve le leurre.

En 2012, l'équipe de Reineke[109] décrit une nouvelle classe de vecteur non viral appelé glycopolymère. Un OLM non modifié de 20 pb dirigé contre NF-κB est délivré dans des cellules NRVMs (cardiomyocytes de rat) en présence ou en absence de ce vecteur. En absence de vecteur, le leurre n'est pas internalisé d'après une observation par microscopie confocale. Par contre, une analyse par cytométrie en flux montre que 85 % des cellules sont transfectées avec une forte intensité de fluorescence et les OLM sont localisés dans le noyau. Ce

glycopolymère est un nouveau vecteur de choix adapté pour la délivrance intranucléaire de leurres moléculaires.

De façon générale, l'efficacité de la thérapie génique utilisant des acides nucléiques est limitée par la délivrance intracellulaire et notamment nucléaire de l'ODN thérapeutique dans le cas de la stratégie leurre moléculaire. De nombreux paramètres conditionnent la mise au point d'un vecteur efficace au niveau cellulaire d'une part et *in vivo* d'autre part (pharmacocinétique).

Année	Equipe	Taille du Leurre Moléculaire	Protection du Leurre Moléculaire	Cible	Cellules testées	Vecteur utilisé	Localisation intracellulaire du leurre moléculaire observée	Remarques	Référence
2012	Reineke	20 pb	Pas de modification	NFKB	NRMVs	aucun ou glycopolymère	Noyau avec glycopolymère. Pas d'internalisation sans vecteur		A
2011	Fagard	33 pb	Protection des extêmités	Stat 3	SW480	Liposome spécifique (liposome + DOPE)	Cytoplasme	Stat3 non phosphorylé : cytoplasmique. Stat 3 phosphorylé : nucléaire. Stat 3 phosphorylé + decoy spé : cytoplasmique. Stat 3 phosphorylé + decoy non spé : nucléaire	B
2011	Hashida	22 pb	Pas de modification	NFKB	Macrophages	Liposomes mannosylés	Avec vecteur : cytoplasme, sans vecteur : nucléaire	Si complexe decoy/Lipo man : accumulation dans cellules, suppression activation NFKB	C
2011	Hashida	20 pb	Phosphorothioates	NFKB	Macrophages alvéolaires	Liposomes mannosylés	Principalement le cytoplasme - Petite quantité dans noyau		D
2011	Kawashima	20 pb	Phosphorothioates	NFKB	Caco-2	PLGA modifié chitosan	Endosomes	Délivrance orale. PLGA approuvé par la FDA	E
2011	Bai			NFKB	HeLa	TransMe transfection	Noyau	Couplage des leurres avec NLS	F
2011	Bae	61 pb	Pas de modification	ERE / P53RE	LoVo, MCF-7, 293T	AuNP	Noyau	Antisens	G
2009	Fagard	31 pb	Protection des extêmités	Stat3	SW480	Liposome cationique. Différents ratios	Cytoplasme	Stat3 phosphorylé + decoy : cytoplasmique	H
2008	Fattal	22 pb	Phosphorothioates	NFKB	RAW 264.7	Liposome composé de DE / Lipofectamine	Nu et complexé : Cytoplasme	0,4 µM.	I
2008	Sun	21 pb	Pas de modification	NFKB	BMEC	PLA nanoparticles	Cytoplasme		J
2009	Ishuguro	20 pb	Phosphorothioates	NFKB	MG-63 et HOS	sans	Cytoplasme + noyau		K
2008	Bickel	20 pb	Pas de modification	NFKB	bEnd5, U937	bPEI 2.7 kDa Pegylée	endosomes		L
2007	Tian	15 pb	Phosphorothioates	Stat3	A549	Lipofectamine 2000	Nucléaire	12,5 25 50 nM	M
2007	Fujimoto	20 pb	Pas de modification	NFKB	Macrophages	(HVJ)-Liposome	Cytoplasme	Le decoy NFKB supprime la translocation nucléaire de NFKB dans les macrophages du foie	N
2007	Fagard	31 pb	Protection des extêmités	NFKB	SW480	Liposome spécifique (liposome + DOPE)	Cytoplasme	Empêche translocation nucléaire de NFKB	O
2006	Ivanovskaya	17/19 pb	trisubstituted pyrophosphate group	NFKB	HCT-116 (colon)	aucun	Cytoplasme	Traitement avec TNF-a : translocation partielle ds noyau	P
2005	Yao			NFKB	BMEC	PLA nanoparticles	Cytoplasme		Q
2005	Huh		Pas de modification	p53	HCT-116 (colon), NHK	GST-7GR-Ga-NLS Ou Lipo 2000	Cytoplasme avec Lipo 2000, Noyau avec GST-7GR_Ga_NLS		R
2002	Alton	20 pb	Phosphorothioates	NFKB	souris	aucun ou lipide GL67	Cytoplasme (cas nu + lipo)		S
2004	Chambers	19 pb	Phosphorothioates	AP-1	KB-3, CHO, MDA-MB-231	Oligofectamine, Polyfect Transfection reagent (dendrimère), Transfectin Lipid Reagent, Fugène 6 Transfection Reagent	Cytoplasme		T
2003	Grandis	15 pb	Pas de modification	Stat3	SCCHN	aucun	Cytoplasme + noyau		U
2002	Sato	14 pb	Hairpin d'un côté	NFKB	LES	PLL-g-HA (polymère)	Cytoplasme.	Blocage translocation nucléaire	V
1998	Dzau	14 pb	Phosphorothioates	E2F	Mesangial cells	Liposome cationique	Nucléaire et cytoplasmique		W

Tableau 1. Etudes récentes sur la localisation intracellulaire par microscopie de fluorescence d'OLM complexés ou non à des vecteurs chimiques.

Références : A : [109], B : [97], C : [88], D : [98], E : [106], F : [110], G : [111], H : [96], I : [90], J : [103], K : [87], L : [100], M : [94], N : [105], O : [95], P : [89], Q : [102], R : [108], S : [91], T : [101], U : [86], V : [99], W : [93]

ii) Développement thérapeutique de la stratégie du leurre moléculaire

Essais thérapeutiques visant à tester l'efficacité des OLM sur des patients atteints d'un cancer

Récemment, l'équipe de Grandis[112] a mis en place un essai clinique de phase 0 afin d'évaluer la faisabilité et la sécurité d'un leurre moléculaire ciblant le facteur de transcription Stat3 pour des patients atteints de tumeurs HNSCC (tumeur tête et cou). Le leurre moléculaire utilisé est un duplexe de 15 pb avec des groupements phosphorothioate aux extrêmités 5' et 3' afin d'augmenter la biostabilité. Aucun vecteur de transfection n'est utilisé. Pour l'essai clinique, une biopsie de la tumeur est tout d'abord réalisée puis des doses du leurre moléculaire allant de 250 µg à 1 mg sont administrées aux patients par une injection intra-tumorale. Les patients témoins reçoivent quant à eux une solution saline. Après l'injection, la tumeur est retirée par un acte chirurgical, une biopsie est réalisée et l'efficacité du leurre moléculaire est déterminée en mesurant l'expression de gènes sous la dépendance de Stat3 par RT-PCR, Western Blot et immunohistochimie. Les auteurs notent qu'aucune toxicité n'a été observée et qu'aucune dose maximale tolérée n'a été atteinte. En analysant les biopsies, les auteurs observent que les gènes sous le contrôle de Stat3, incluant la cycline D1 et Bcl-X_L, sont moins fortement exprimés dans les tumeurs après traitement par rapport aux tumeurs avant traitement ou après injection saline. Les auteurs précisent qu'ils n'ont pas observé d'effet dose sur les niveaux d'expression des gènes cibles. Ces résultats montrent que l'administration intra-tumorale d'un leurre moléculaire ciblant Stat3 est sans danger et peut diminuer l'expression des gènes cibles de Stat3 dans les tumeurs HNSCC. Ce protocole reste cependant expérimental et a priori pas utilisable en thérapeutique.

Utilisation de leurres moléculaires dans les pathologies cardiaques

Le premier OLM testé cliniquement est l'édigifolide. Il a été développé pour cibler le facteur de transcription E2F[71] qui joue un rôle clé dans la sur-régulation des gènes impliqués dans l'hyperplasie néointimale, ce qui conduit à l'athérosclérose et à la thrombose[3]. Les essais précliniques, ainsi que les essais cliniques de phases I et II[113,114] concernent le pontage coronarien par chirurgie en utilisant une veine du patient préalablement retirée et incubée *in vitro* en présence d'édifoligide. En essai clinique de phase II B, il a permis d'augmenter la réussite de pontage aorto-coronarien[115]. Cependant, en phase III, testé sur 1508 patients, il n'a

pas prouvé son potentiel thérapeutique par rapport à un placebo. Deux raisons pourraient expliquer cet échec : i) l'existence d'isoformes de E2F dont l'activité est soit négative soit positive dans l'efficacité du pontage coronarien ; il est possible alors que le leurre puisse inhiber un isoforme de E2F impliqué dans l'efficacité du pontage. ii) le piégeage de la forme E2F impliquée dans la baisse de l'efficacité du pontage n'est pas suffisante du fait d'une compétition avec les différents isoformes[116]

La société Angès MG, basée au Japon, est une compagnie pharmaceutique développant des leurres moléculaires qui a initié au cours des dernières années plusieurs essais cliniques. Selon les informations communiquées sur leur site internet (anges-mg.com/en), 3 essais cliniques avec le leurre NF-κB sont en cours. Un essai clinique de phase II au Japon et de phase préclinique dans d'autres pays sont en cours pour le traitement de la dermatite atopique. Enfin, ce leurre est en cours d'essai clinique au Japon pour la prévention des resténoses vasculaires par application locale au cours du cathétérisme vasculaire chez l'homme.

L'équipe de Morishita a axé son travail sur l'utilisation d'OLM pour des applications thérapeutiques dans les pathologies cardiaques. L'infarctus du myocarde résulte de dommages sévères des cardiomyocytes et des cellules endothéliales[117]. Il a été montré que l'activité de NF-κB est augmentée dans cette pathologie. En 1997[118], il a été montré qu'un leurre NF-κB peut se lier à NF-κB et bloque l'activation des gènes responsables de l'infarctus du myocarde. Le rejet de greffe limite la survie à long terme des receveurs après une transplantation cardiaque[117]. En 2000[119], l'équipe réalise des transplantations cardiaques chez la souris en présence d'un leurre ciblant NF-κB ou d'un leurre non spécifique transfecté à l'aide du vecteur viral HVJ-liposome. Le leurre ciblant NF-κB a permis d'éviter une inflammation et de limiter les rejets suite à la greffe cardiaque. En 2009[120], l'équipe décrit que l'échec d'une transplantation est du au rejet sévère et aux maladies du greffon artériel. Le choix de la cible du leurre apparaît être un élément important à prendre en considération. En effet, le ciblage de NF-κB par un leurre moléculaire diminue la maladie du greffon artériel mais ne permet pas d'atténuer le phénomène de rejet sévère. Enfin, le ciblage par un OLM ciblant AP-1 et par un OLM ciblant STAT-1 délivrés en même temps en application locale lors de la transplantation évite les deux problèmes liés à l'échec de la transplantation. Les leurres moléculaires ont également été utilisés dans le traitement de la resténose après angioplastie. Des expériences *ex vivo* sur des cœurs de souris ou de singes utilisant des OLM ciblant E2F vectorisés avec des

HVJ-liposomes ont permis de montrer que le leurre évite la formation d'une resténose et que des gènes de régulation du cycle cellulaire ne sont pas surexprimés contrairement à ce qui se produit au cours de la resténose[121].

Dans des expériences *in vivo*, l'utilisation de leurres ciblant NF-κB au niveau de l'artère carotide de rats a permis d'obtenir une inhibition de la resténose 14 jours après avoir provoqué le rétrécissement artériel[122]. De plus, les gènes ICAM-1 et VCAM-1 sous la dépendance de NF-κB sont inhibés dans les vaisseaux transfectés avec un OLM anti NF-κB. Un OLM ciblant NF-κB a été testé sur deux patients atteints de resténose après une intervention coronarienne percutanée[123]. Pour ces deux patients, la resténose a été évitée et aucun effet secondaire n'a été observé. Il s'agit du premier essai clinique montrant l'efficacité de la transfection de leurre ciblant NF-κB sur un site de sténose dans une artère coronaire. Les auteurs concluent que l'utilisation d'un leurre ciblant NF-κB est bénéfique mais que d'autres essais doivent être envisagés pour prouver un effet clinique. Le patient numéro 1 de cette étude a été revu quatre ans plus tard et sans apparition de resténose[124].

La difficulté récurrente dans le développement de la stratégie leurre moléculaire reste l'efficacité de délivrance et donc le choix du système de vectorisation. Chaque système a des propriétés uniques et des conditions spécifiques d'utilisation[120]. Le choix de l'équipe de Morishita a été d'utiliser le HVJ liposome. Cependant, l'équipe s'est ensuite orientée vers la délivrance par voie orale de leurres couplés au PLGA[106] et une étude rapporte la vectorisation d'OLM sous forme « dumbbell » avec le PLGA[125].

B) ODN leurre moléculaire pour un multiciblage de facteurs de transcription

La majorité des OLM qui ont été développés ne ciblent donc qu'un seul facteur de transcription du fait qu'ils sont courts et ne contiennent qu'une séquence de liaison au facteur de transcription. L'équipe de Wang[126] a développé un leurre moléculaire ayant la propriété de posséder plusieurs éléments de reconnaissance de facteurs de transcription. Si plusieurs protéines cibles sont inhibées en même temps par la même molécule, le blocage de plusieurs voies cellulaires impliquées dans le cancer devrait permettre d'augmenter l'efficacité de l'agent thérapeutique. Ces auteurs ont donc développé un OLM entièrement phosphorothioate de 37 pb et possédant 3 sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription Stat3, NF-κB et E2F. Après transfection des leurres en utilisant la Lipofectamine 2000, les auteurs ont

observé que le leurre possédant les 3 sites de reconnaissance à un effet 2 fois plus important que le leurre possédant 1 seul site de reconnaissance. De la même façon, la diminution de la viabilité cellulaire observée avec le leurre ciblant 3 facteurs de transcription est obtenue plus rapidement qu'avec le leurre ciblant 1 seul facteur de transcription. Ils précisent également qu'avec le leurre ciblant 1 seul facteur de transcription, une croissance des cellules est obtenue après 72h, ce qui n'est pas le cas avec le leurre ciblant 3 facteurs de transcription. Par conséquent, le ciblage simultané de plusieurs facteurs de transcription différents permet d'augmenter les effets anticancéreux en comparaison au ciblage d'une seule protéine. Les résultats de cette étude sont néanmoins à prendre avec précaution. Les auteurs précisent eux-mêmes qu'ils ne peuvent pas conclure sur le rôle de l'organisation de multiples éléments cis dans un même leurre moléculaire. En effet, dans la construction utilisée, les sites de reconnaissance de NF-κB et de E2F sont chevauchants. Ainsi, il est peu probable qu'un seul leurre puisse fixer en même temps ces 2 facteurs de transcription. Dans ce travail, il est probable que seulement une petite proportion du leurre soit capable de fixer plusieurs facteurs de transcription du fait d'un encombrement stérique. L'efficacité de ce type de leurre proviendrait donc plutôt d'un effet additif d'OLM monosites. La nécessité d'introduire des modifications chimiques pour augmenter la biostabilité à un coût d'autant plus important que l'OLM est long.

Un multiciblage de NF-κB et Ets1 a été reporté dans le but de réduire le risque d'anévrisme aortique abdominal dans un modèle animal (rat, lapin)[127,128]. L'oligodésoxynucléotide leurre moléculaire de 26 paires de base contient des sites séparés de Ets1 et NF-kB ; cependant, on sait que la protéine Ets1 interagit très faiblement avec un seul site consensus du fait de son mécanisme d'autoinhibition ce qui limite probablement l'efficacité de cet OLM. Ce leurre moléculaire chimérique NFκB/Ets1 a aussi été utilisé sous une forme « dumbbell »[129].

C) Autres leurres moléculaires

i) Stratégie « Dbait »

La stratégie développée par DNA Therapeutics (compagnie de biotechnologie française cofondée par le Prof. Jian-Sheng Sun et le Dr. Marie Dutreix) est d'utiliser des ODNs appelés Dbait capables d'inhiber la réparation des cassures double brin de l'ADN engendrées par la radiothérapie anticancéreuse. Cette stratégie a été développée du fait de résistance cellulaire dépendante d'un système de réparation très efficace dans les cellules cancéreuses : le système de réparation de l'ADN « Non Homologous End Joining » (NHEJ) ; ce système permet de signaler via la protéine hétérodimérique Ku l'existence de coupure double brin puis de recruter des protéines kinases ADN dépendantes (DNA-PK) entraînant ensuite la phosphorylation de l'histone H2AX et un changement local de la chromatine. Le recrutement de protéines de réparation (ligase IV, XRCC4 et XLF) avec DNA-PK et Ku forment un complexe capable de réparer une cassure double brin. Le Dbait est une molécule d'ADN double brin linéaire de 32 pb en forme de tige boucle constituée d'extrémités 5' et 3' franches d'un côté et d'un linker hexaéthylèneglycol de l'autre côté. Chaque extrémité possède 3 nucléotides de type phosphorothioate (extrémité 3' et 5') pour augmenter la biostabilité du Dbait. Les extrémités du Dbait miment une cassure double brin permettant le recrutement de Ku, l'activation de la DNA-PK et la phosphorylation de H2AX. Si le Dbait a bien une activité de leurre moléculaire au départ via le recrutement de Ku, on voit qu'il se différencie des leurres classiques ciblant des facteurs de transcription puisqu'il active et non pas inhibe une fonction cellulaire et d'autre part, il recrute un complexe protéique et non une seule protéine. Il est intéressant de remarquer que le Dbait ne possède plus d'activité quand sa longueur est inférieure à 24 paires de bases[130,131]. Ce résultat devrait être pris en compte dans la stratégie du leurre moléculaire anti facteur de transcription car on ne peut pas exclure que des ODN leurres linéaires longs (au-delà de 30 pb environ) ne puissent pas aussi mimer des cassures double brin. Cette situation est notamment possible dans le cas des ODN linéaires multisites de 37 pb développés par l'équipe de Wang[126] et qui seront décrits ultérieurement. Comme dans le cas d'un OLM dirigé contre un facteur de transcription, le Dbait devrait avoir une activité optimale au niveau du noyau. La preuve de l'efficacité de Dbait *in vivo* a été faite sur différents types de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris en association avec la radiothérapie. Notamment la phosphorylation de H2AX est bien augmentée dans les tumeurs en présence de Dbait démontrant sa propriété de mimer une cassure double brin in vivo[130,132].

Comme nous l'avons déjà souligné, un problème dans le développement de thérapie à base d'acides nucléiques est la mise au point de système de délivrance efficace et non toxique. Bien que le Dbait ait été transfecté au départ au moyen de vecteurs comme le Superfect ou la PEI (de différentes tailles, branchée ou non), la forte toxicité de ces polymères cationiques a conduit à élaborer le CoDbait qui possède en 5' une chaîne triéthylène glycol couplée à un groupement cholestérol[133]. Bien que le CoDbait possède une modification de l'extrémité mimant une cassure double brin, cette molécule active bien la phosphorylation de H2AX ; bien que la dose efficace soit plus élevée que pour le Dbait, la toxicité de CoDbait est très faible, ce qui a permis DNA Therapeutics à utiliser récemment CoDbait en essai pré clinique par injections locales chez des patients atteints de mélanomes métastasés en combinaison avec de la radiothérapie.

ii) Leurre anti ADN méthylase

Récemment, l'équipe de Carell a mis au point un leurre moléculaire inhibiteur d'une méthyltransférase[134]. Il s'agit d'un duplexe de 18 pb qui contient un motif CpG triplement hémi-méthylé comme séquence de reconnaissance de la méthyltranférase humaine Dnmt1. Aucune application thérapeutique n'a été reportée pour le moment.

iii) ODN immunostimulant

En 2012, l'équipe de Weiner[135] rapporte les résultats d'un essai clinique utilisant le CpG7909 dans des patients atteints de leucémies lymphocytaires chroniques (LLC). Le CpG 7909 (ProMune™) est un ODN ADN de 24 bases sb, contenant 4 motifs CpG non méthylés avec un squelette phosphorothioate et qui est un agoniste du récepteur TLR9 exprimé dans les cellules B et les cellules dendritiques du plasma. Cette molécule est endocytée par les lymphocytes B et se lie avec le TLR9 dans le compartiment endosomal où elle forme un complexe de signalisation. Dans le traitement des LLC, le CpG 7909 permet l'augmentation de l'apoptose des cellules LLC (sous population de cellules B malignes). Un test clinique de phase I réalisé sur 41 volontaires sains a été réalisé afin de vérifier l'innocuité de ce produit qui est bien toléré en injection sous cutanée. Une thérapie multi dose avec des injections sous-cutanées de CpG 7909 devrait commencer dans un essai clinique de phase II.

iv) Molécule à activité leurre moléculaire et antisens

Une molécule possédant 2 activités a été développée[136]. Cette molécule comprend une ou deux séquences qui correspondent à des éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE) mais également une séquence simple brin qui peut s'hybrider au pré-ARN-m ou à l'ARN-m de Bcl-2. Cette construction bifonctionnelle permet de fixer différentes cibles avec des fonctions biologiques différentes : une fonction leurre moléculaire ciblant un facteur de transcription et une fonction antisens ciblant un ARN-m.

II) Facteurs de transcription et multiciblage

II-A) Les facteurs de transcription

1) Généralités sur la transcription et les facteurs de transcription

La transcription dans les organismes eucaryotes est régulée par 2 classes de facteur de transcription, les facteurs de transcription généraux qui se lient sur un promoteur situé près d'un site d'initiation de la transcription et les facteurs de transcription séquence spécifique qui se lient sur des sites de fixation situés à une distance plus ou moins importante en amont du site d'initiation de la transcription[137]. Typiquement, les facteurs de transcription spécifiques contiennent une séquence spécifique de liaison à l'ADN et une région « trans-activante » qui interagit avec d'autres facteurs. Les séquences d'ADN en double brin reconnues par les facteurs de transcription sont composées de quelques nucléotides (5 à 10) et la spécificité d'un facteur de transcription est définie par son interaction avec son site de liaison[138]. La région trans activante qui permet l'interaction avec d'autres facteurs permet l'assemblage des différents facteurs en une combinaison unique et avec une structure tridimensionnelle définie appelée enhanceosome[137].

La Figure 11 montre la fixation de différents facteurs de transcription sur les éléments de reconnaissance situés en amont du gène codant pour l'interféron β (IFN-β) formant un enhanceosome[139]. L'expression des gènes codant pour l'IFN-β requiert l'activation coordonnée de 4 facteurs de transcription : ATF-2/c-Jun, IRF-3, IRF-7 et NF-κB (p50/RelA)[140]. *In vivo*, ces facteurs de transcription se lient coopérativement dans le promoteur de l'IFN-β situé de -102 à -47 paires de bases avant le début du site de transcription[139]. Après assemblage de ces facteurs de transcription sous forme d'enhanceosome, un recrutement de GCN5 et CBP/p300 conduit à l'acétylation des nucléosomes situés à proximité de l'enhanceosome et à un remodelage de la chromatine par le complexe SWI/SNF repositionnant ainsi les nucléosomes qui recouvraient la « TATA box » et le site d'initiation de la transcription Ceci permet à la TBP (TATA binding protein) et à l'ARN polymérase II d'accéder au promoteur et d'initier la transcription. Comme nous le verrons plus tard, la formation de boucles d'ADN formant des domaines isolés dans lesquels l'ADN est courbé et contraint joue un rôle au niveau de la transcription elle-même.

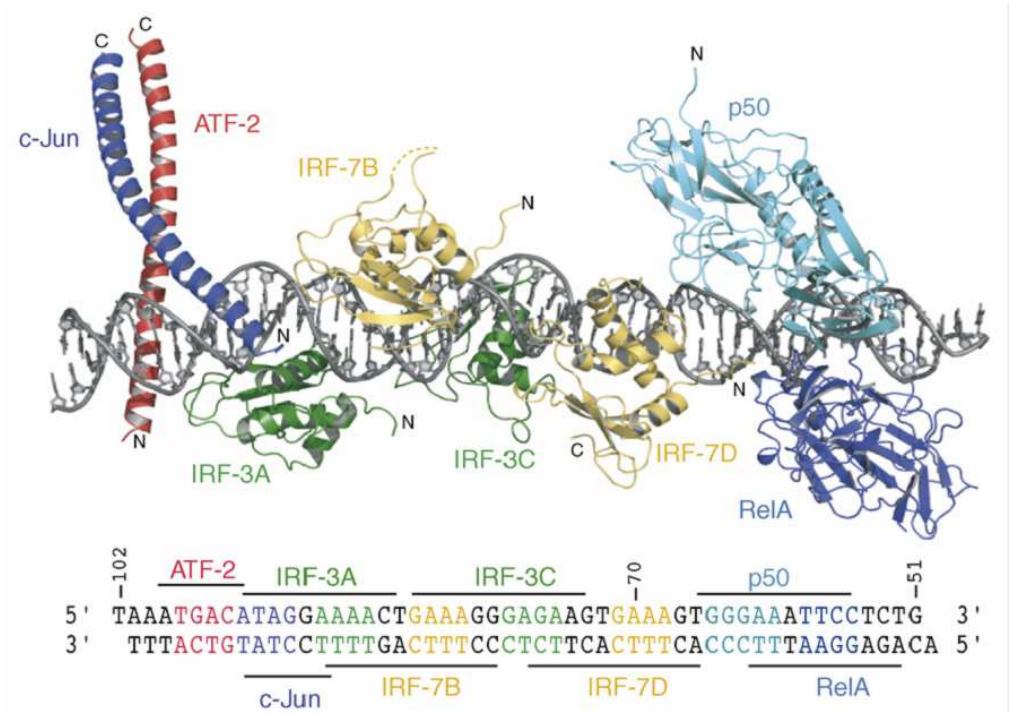


Figure 11. Modèle atomique de l'enhanceosome situé en amont du gène codant pour l'interféron β.
D'après Panne[139].

De nombreux facteurs de transcription sont recensés. La base de données Transfac Rel. 7.0 (gene-regulation.com) recense 6133 facteurs de transcription[141]. Une autre base de donnée, Jaspar[142] (jaspar.genereg.net), recense également les facteurs de transcription et leurs séquences consensus. Il est possible de prédire à l'aide de logiciels spécifiques disponibles sur internet si une séquence d'ADN est susceptible ou non d'être liée par un facteur de transcription. La base de données Jaspar intègre son propre logiciel de recherche. Pour effectuer une recherche dans la base de donnée Transfac, il est possible d'utiliser le logiciel Match (gene-regulation.com) ou le logiciel TESS (cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess). Dans tous les cas, le logiciel définit un score correspondant à la probabilité d'interaction de la séquence d'ADN donnée avec les facteurs de transcription intégrés dans les bases de données.

Si l'on considère la classification des facteurs de transcription de la base de données Transfac (gene-regulation.com/pub/databases/transfac/clSM.html) (Figure 12), les facteurs de transcription ont été regroupés en 4 superfamilles plus une superfamille 0 qui correspond aux facteurs de transcription non intégrables dans les 4 superfamilles. Ces superfamilles ont été établies à partir de la structure des facteurs de transcription. La première superfamille correspond aux « domaines basiques ». Les facteurs de transcription sont caractérisés par un large excès de charges positives qui évitent que les facteurs de transcription soient

complètement structurés en solution mais adoptent une structure en hélice α lorsqu'ils interagissent avec l'ADN[143]. Traditionnellement, cette famille possède souvent un domaine de dimérisation, une glissière à leucine (leucine zipper) ou un domaine hélice boucle hélice[144]. La dimérisation donne une accessibilité des deux régions basiques à l'ADN au niveau du petit sillon[145]. Par exemple, AP-1 et Nrf2 appartiennent à la famille glissière à leucine et MyoD et Twist à la famille hélice boucle hélice. La deuxième superfamille correspond à des facteurs de transcription possèdant un motif de type doigt de zinc. Les motifs en doigt de zinc forment de petits domaines repliés indépendamment du reste de la structure protéique autour d'un ion zinc. La liaison à l'ADN de ces motifs passe par l'interaction de 3 acides aminés d'une hélice α et de 3 bases sur l'ADN (facteurs GATA, Sp1….). La troisième superfamille correspond aux « domaines hélice tour hélice » (HTH). Le motif HTH est un des domaines de liaison à l'ADN les plus répandu au cours de l'évolution[146]. La majorité des structures tridimensionnelles des facteurs de transcription spécifiques qui ont été rapportées reconnaissent l'ADN à travers un motif HTH[137]. Le motif HTH est généralement composé de 20 acides aminés formant 2 hélices α connectées par quatre acides aminés. Une de ces deux hélices α permet la reconnaissance séquence spécifique de l'ADN du grand sillon. E2F ou Ets1 appartiennent à cette superfamille. La quatrième famille correspond aux « facteurs à architecture β » qui interagissent avec le petit sillon de l'ADN. Cette superfamille regroupe 11 classes de facteurs de transcription. Parmi les facteurs de transcription connus, on retrouve dans cette catégorie, NF-κB, Stat3 bien que ces facteurs de transcription interagissent avec le grand sillon de l'ADN. La superfamille 0 correspond aux facteurs de transcription qui n'ont pas été recensés dans les superfamilles précédemment citées.

1 *Superclass*: Basic Domains 1.1 *Class*: Leucine zipper factors (bZIP). 1.2 *Class*: Helix-loop-helix factors (bHLH). 1.3 *Class*: Helix-loop-helix / leucine zipper factors (bHLH-ZIP). 1.4 *Class*: NF-1 1.5 *Class*: RF-X 1.6 *Class*: bHSH	**4 *Superclass*: beta-Scaffold Factors with Minor Groove Contacts** 4.1 *Class*: RHR (Rel homology region). 4.2 *Class*: STAT 4.3 *Class*: p53 4.4 *Class*: MADS box. 4.5 *Class*: beta-Barrel alpha-helix transcription factors 4.6 *Class*: TATA-binding proteins 4.7 *Class*: HMG. 4.8 *Class*: Heteromeric CCAAT factors 4.9 *Class*: Grainyhead 4.10 *Class*: Cold-shock domain factors. 4.11 *Class*: Runt.
2 *Superclass*: Zinc-coordinating DNA-binding domains 2.1 *Class*: Cys4 zinc finger of nuclear receptor type. 2.2 *Class*: diverse Cys4 zinc fingers. 2.3 *Class*: Cys2His2 zinc finger domain. 2.4 *Class*: Cys6 cysteine-zinc cluster. 2.5 *Class*: Zinc fingers of alternating composition	**0 *Superclass*: Other Transcription Factors** 0.1 *Class*: Copper fist proteins 0.2 *Class*: HMGI(Y) 0.3 *Class*: Pocket domain 0.4 *Class*: E1A-like factors 0.5 *Class*: AP2/EREBP-related factors
3 *Superclass*: Helix-turn-helix 3.1 *Class*: Homeo domain. 3.2 *Class*: Paired box. 3.3 *Class*: Fork head / winged helix. 3.4 *Class*: Heat shock factors 3.5 *Class*: Tryptophan clusters. 3.6 *Class*: TEA domain.	

Figure 12. Les différentes classes de facteurs de transcription définies par la base de données Transfac.

2) Le facteur de transcription NF-κB

NF-κB correspond à une famille de facteurs de transcription constituée de 15 dimères qui résultent de différentes combinaisons entre 5 protéines [Rel (c Rel), Rel A (p65), Rel B, NF-κB-1 (p105/p50) et NF-κB-2 (p100/p52)][147]. Chacune de ces sous unités contient un domaine d'homologie Rel (RHR pour rel homologie region) de 300 acides aminés environ selon la sous unité protéique, qui a la capacité de lier une séquence d'ADN spécifique[148]. Ces dimères régulent l'expression d'une grande variété de gènes. Par exemple, parmi les gènes régulés par NF-κB, certains codent pour des cytokines (IL-6, IL-12, TNF-α, LTα, LTβ, GM-CSF), des chimiokines (IL-8, IL-12, MIP-1α, MCP1, RANTES, eotaxin), des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM, VCAM, E-selectin) ou des enzymes inductibles (iNOS, Cox2) (liste réalisée par Ghosh et Karin[149]). De plus, NF-κB joue un rôle central dans la survie cellulaire en activant des gènes impliqués dans l'apoptose et la prolifération cellulaire, comme c-IAP-1, c-IAP-2, A1, Bcl-XL, Fas ligand, c-myc et la cycline D1[149].

Le fonctionnement général de NF-κB est décrit par Barnes et Karin[150] et représenté schématiquement sur la Figure 14. La forme la plus abondante de NF-κB est le dimère p50/p65. Dans une cellule non stimulée, NF-κB est localisé dans le cytoplasme et est lié à IκBα et à IκBβ qui maintiennent NF-κB dans le cytoplasme. Pour cela, IκBα masque le signal

d'importation nucléaire (NLS) de p65[149]. Lorsque les cellules sont stimulées (par'IL-1β ou le TNF-α par exemple), des kinases spécifiques phosphorylent 2 résidus sérine sur IκBα, qui est ensuite ubiquitinylé et enfin dégradé dans le protéasome[151,152,153]. NF-κB n'étant plus lié à IκB et ayant un NLS libre, la protéine est importée dans le noyau où elle va se lier à des séquences spécifiques d'ADN consensus (la séquence consensus reconnue étant GGGRNWYYCC avec R, N, W, Y étant respectivement une purine, n'importe quelle base, A ou T, une pyrimidine) dans les régions promotrices des gènes cibles. Etant donné que le gène IκBα a une séquence de reconnaissance κB dans sa région promotrice, l'induction de NF-κB permet la transcription du gène IκBα ; la protéine IκB entre dans le noyau pour se lier à NF-κB activé et le transporte dans le cytoplasme afin de terminer l'activation de l'expression des gènes induite par NF-κB[154] par une boucle de rétrocontrôle. Il existe neuf voies de régulation de l'activité de NF-kB ; les voies alternatives et atypiques de fonctionnement de NF-κB sont décrites dans une revue de Perkins et Gilmore[155].

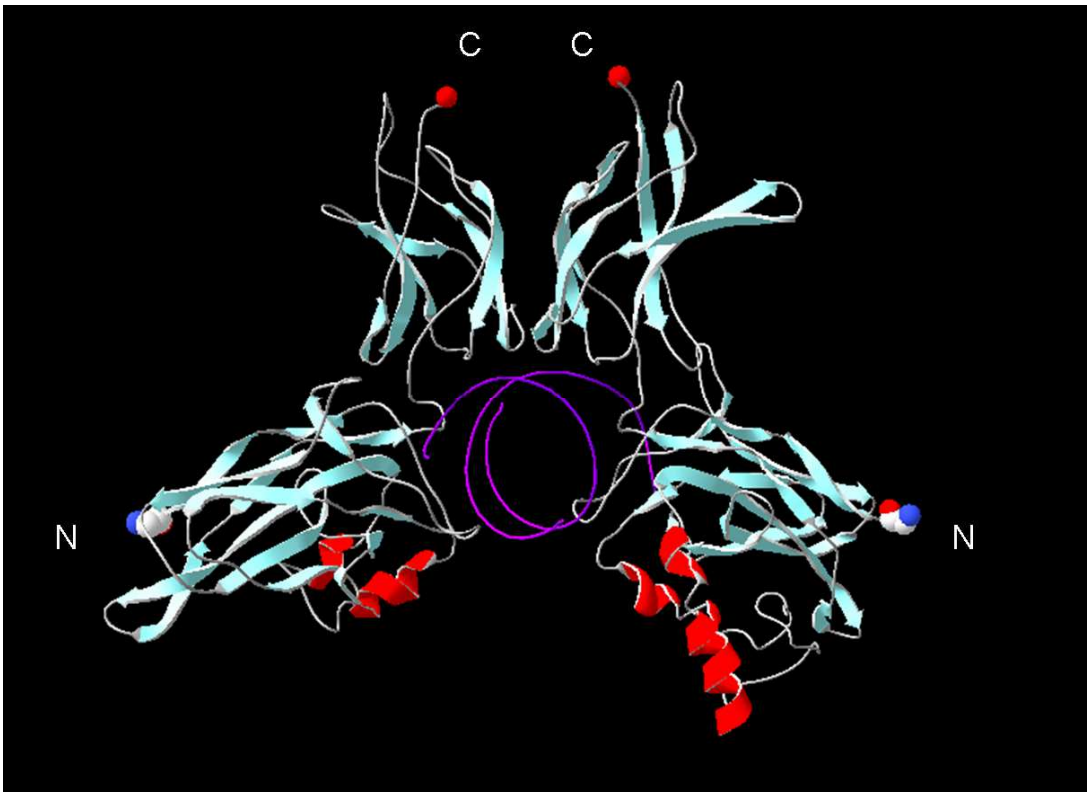


Figure 13. Structure du dimère NF-κB p50/p65.
La partie C-ter est impliquée dans la dimérisation et la partie N-ter est impliquée dans l'interaction avec IκB et dans la liaison spécifique au site consensus de l'ADN (GGGRNWYYCC). L'interaction a lieu dans le grand sillon de l'ADN avec des résidus de la protéine présents dans cinq différentes boucles du domaine RHR. Dans le complexe, l'ADN est courbé vers le grand sillon d'environ 20 à 40°. Ce facteur de transcription se fixe avec une forte affinité sur la séquence consensus (K_d de 20 nM environ). D'après Chen et coll[156]. Numéro d'accesion à la Protein Data . Bank : 1VKX.

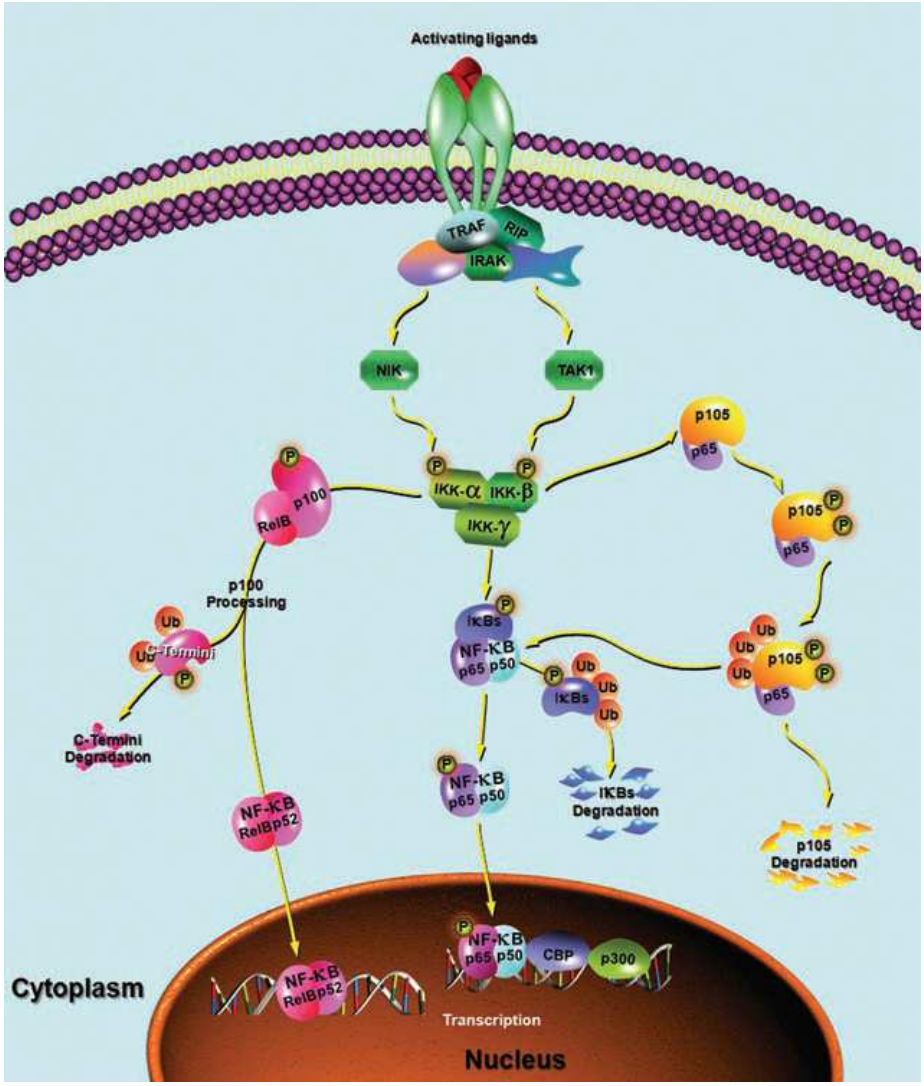


Figure 14. Schéma du fonctionnement de la voie de signalisation NF-κB dans une cellule.
La voie principale correspond à celle décrite avec le dimère p50/p65. La voie alternative est celle décrite avec le dimère RelB/p100. Figure extraite de Mohamed et McFadden[157].

Il a été montré que NF-κB est suractivé dans plusieurs tumeurs et dans différentes lignées cellulaires cancéreuses[158]. NF-κB est donc une cible thérapeutique validée non seulement dans le cancer mais dans d'autres maladies impliquant un désordre de l'inflammation[150]. Diverses stratégies ont été utilisées en ce sens, comme l'utilisation d'un antisens dirigé contre la sous unité p65 de NF-κB[159], l'utilisation du peptide SN50 qui inhibe la translocation de NF-κB dans le noyau[160], l'utilisation de petites molécules chimique inhibant la phosphorylation de IκB (inhibiteur de kinase) l'augmentation de la liaison de NF-κB à l'inhibiteur IκBα[161,162], l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome (bortézomibe) ou encore l'utilisation de leurres moléculaires.

II-B) Multiciblage

Les progrès de la biologie montre l'enchevêtrement des voies de signalisation cellulaire qui lorsqu'elles sont dérégulées conduisent à une pathologie. Ce fait est contradictoire avec la conception de nouveaux médicaments dirigées contre une seule cible thérapeutique, ce concept étant toujours majoritairement suivi pour obtenir des molécules spécifiques[163,164]. Un article de revue récent montre que depuis une dizaine d'année, les molécules thérapeutiques efficaces ciblent en fait plus d'une cible thérapeutique[165]. Cette observation peut être liée à la découverte fortuite de nouvelles cibles pour une molécule conçue au départ pour un ciblage simple et/ou à la recherche rationnelle de molécules dirigées directement contre plusieurs cibles. L'imatinib, un inhibiteur de plusieurs tyrosine kinases possède un meilleur effet anticancéreux que le gefitinib que est dirigé contre une seule cible[166]. Récemment, ce concept de multiciblage a été utilisé pour mettre au point un nouvel inhibiteur de kinase de la voie phosphatidylinositol 3-kinase bloquant la phosphorylation de 5 protéines kinase permettant d'augmenter l'effet antitumoral[167]. Enfin, ce concept de multiciblage est directement validé par l'efficacité de la combinaison de molécules thérapeutiques qui est pratiquement toujours utilisée dans le traitement du cancer et d'autres maladies[165].

Des études par analyse globale permettent par des approches de bioinformatique de cartographier des cibles protéiques impliquées dans une pathologie. Par exemple comme indiqué dans la Figure 15, une analyse globale de facteurs de transcription impliqués dans le cancer colorectal montre notamment que les facteurs de transcription NF-κB, Stat3 et Ets1 participent à différents aspects du développement de cancer.

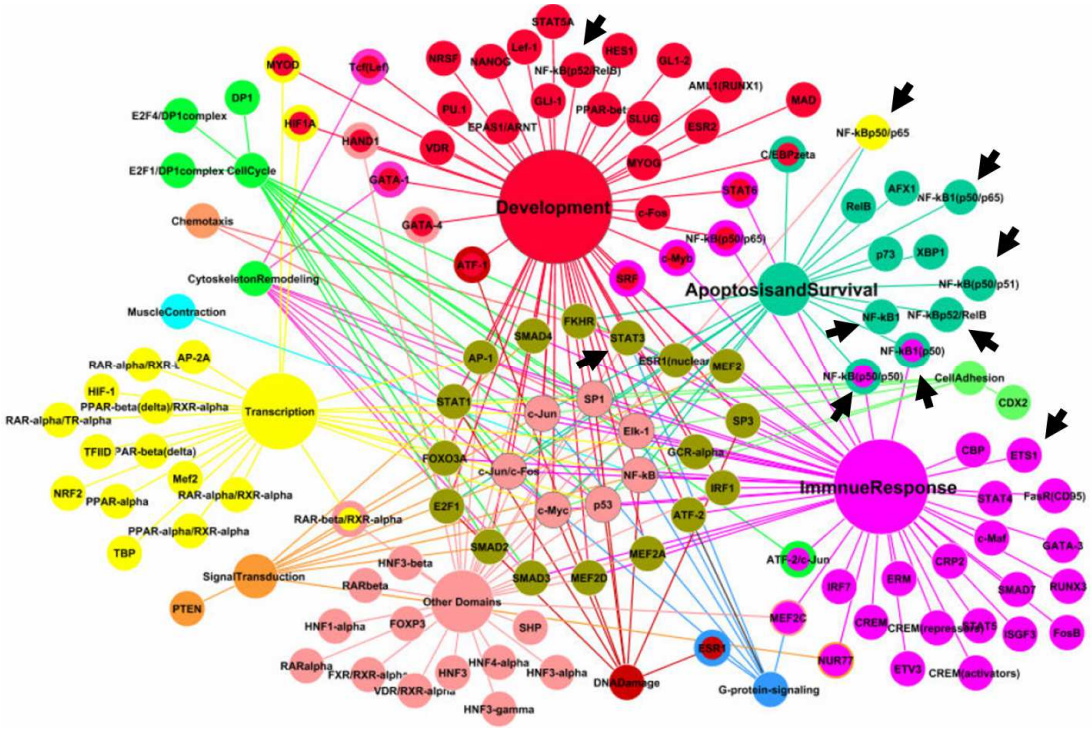


Figure 15. Analyse globale de facteurs de transcription impliqués dans le cancer colorectal
D'après Pradhan et coll[168]

Un autre exemple est indiqué dans une revue récente[169] qui montre des interactions fonctionnelles entre les facteurs de transcription Stat3 et NF-κB dans le cancer. Stat3 et NF-κB sont régulés par des mécanismes moléculaires différents. Néanmoins, ces 2 facteurs de transcription sont des activateurs d'un état cellulaire malin et contrôlent l'expression des gènes cibles impliqués pour la prolifération cellulaire, la survie, l'angiogénèse, la réparation tissulaire[170–173]. Stat3 se lie à 3000 promoteurs de gènes différents et le nombre de gènes ciblés par la famille NF-κB est bien supérieur[169]. Si Stat3 et NF-κB peuvent contrôler chacun de façon indépendante l'expression d'un gène (Figure 16A), ces 2 facteurs de transcription co-régulent l'expression de gènse (Figure 16B). Ainsi, dans des cellules malignes, si des gènes anti-apoptotiques comme A1 et c-FLIP sont principalement NF-κB dépendants et d'autres comme Mcl-1 et Survivin sont Stat3 dépendants, les gènes Bcl-xL, Bcl-2 et c-IAP2 sont activés par les 2 facteurs (pour revue [169]). De la même façon, l'inhibition de Stat3 ou de NF-κB conduit à l'augmentation de p53 dans la cellule, l'inhibition des 2 protéines induit donc une augmentation plus importante de p53.

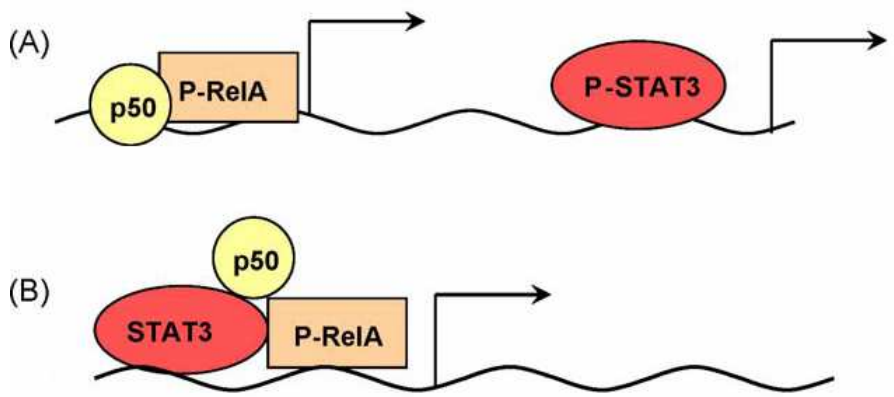


Figure 16. Intervention de NF-κB et de Stat3 dans le contrôle de la transcription
En A, Stat3 et NFκB peuvent activer de façon indépendante un gène sous leur dépendance
En B, Stat3 et NF-κB doivent interagir entre eux pour activer le gène sous leur dépendance
D'après Grivennikov et Karin[169]

De la même façon, certaines cytokines sont synthétisées sous le contrôle de NF-κB, Stat3 ou des 2 facteurs de transcription (Tableau 2). De façon intéressante, on peut constater que la cytokine IL-6 est sous la forte dépendance de NF-κB et de Stat3. Or, dans les cellules HNSCC (cellules du carcinome tête et cou), la production d'IL-6 est sous le contrôle de NF-κB (élément de reconnaissance de -75 à -63 pb avant le site d'initiation de la transcription d'IL-6) et de AP-1 (élément de reconnaissance de -286 à -265 pb avant le site d'initiation de la transcription d'IL-6). L'inhibition de NF-κB conduit à la diminution de l'expression d'IL-6 et d'autres cytokines (IL-8, IL-10, GM-CSF). Or, le blocage de NF-κB conduit également à une diminution drastique de l'activité constitutive de Stat3 dans les cellules[174,175].
Ces observations démontrent l'existence d'interconnexions entre les voies NF-κB et Stat3 dans les cellules HNSCC[176]. A l'heure actuelle, il n'existe pas de stratégie à notre connaissance permettant un multiciblage efficace des facteurs de transcription NF-kB et Stat3.

Cytokine	Inducibility by STAT3	Inducibility by NF-κB
TNF-α	–	+++
IL-6	+++	+++
IFNγ	–	+
IL-23	+++	+++
IL-22	+++	+
IL-17	+++	+
IL-27	++	++
IL-1	–	+++

Tableau 2. NF-κB et Stat3 contrôlent la production de cytokines
D'après Grivennikov et Karin[169]

Dans les cellules SCLC (petites cellules cancéreuses du poumon), il a été montré que la surexpression du facteur de transcription Nfib (régule l'expression de gènes permettant la différenciation du poumon) était corrélée à la surexpression de L-myc (proto-oncogène retrouvé dans les cellules SCLC). Ces 2 facteurs de transcription, sous certaines conditions dans les cellules SCLC, doivent donc agir de façon synergique[177]. Enfin, l'équipe de Pau a fait un bilan des facteurs de transcription exprimés dans des cellules NSCLC (cellules cancéreuses du poumon). Les résultats obtenus montrent 19 facteurs de transcription exprimés avec 81 interconnexions entre eux. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de 64 gènes cibles.

Ces résultats suggèrent fortement que le ciblage d'un seul facteur de transcription dans une cellule n'est pas suffisant pour obtenir un effet thérapeutique efficace. De même, l'inhibition d'un facteur de transcription ne conduit pas forcément à l'inhibition des gènes cibles désirés si le gène ciblé est régulé par plusieurs facteurs de transcription. Par conséquent, le développement d'une molécule permettant de cibler en même temps plusieurs facteurs de transcription devrait présenter une meilleure efficacité thérapeutique.

Un exemple de multiciblage développé actuellement concerne des éponges à microARN (miRNA)[178,179]. Cette stratégie a été développée pour augmenter l'efficacité du ciblage d'un miRNA. En effet, il est connu que plusieurs miARN sont impliqués dans une fonction cellulaire en inhibant la transcription de multiples gènes. Il est par conséquent nécessaire de cibler en même temps plusieurs ARN-m différents. Le principe de cette stratégie est d'utiliser un ODN long contenant plusieurs copies d'une séquence complémentaire d'un miRNA cible (sorte de leurre à miRNA). La plupart du temps, c'est la transcription intracellulaire d'un plasmide contenant ces séquences qui est utilisé pour produire un ARN antimir sans codon de traduction. Chaque éponge à ARN peut piéger par hybridation jusqu'à 7 miRNA. Cette stratégie présente quelques inconvénients comme la formation de structures reconnues non spécifiquement par des protéines, la biostabilité et surtout le risque de s'hybrider sur d'autres séquences de façon non spécifique.

Dans la stratégie du leurre moléculaire, l'équipe de Wang a développé un leurre moléculaire ayant la propriété de posséder plusieurs éléments de reconnaissance de facteurs de transcription[126]. Comme on peut le voir sur la Figure 17, les sites de NF-kB et E2F sont chevauchants et le site de Stat3 est situé à 3 nucléotides du site de NF-κB. Comme nous l'avons déjà remarqué précédemment, cet OLM ne peut pas interagir simultanément avec les 3 facteurs de transcription ciblés ce qui a été validé indirectement par les auteurs eux-mêmes dans leur conclusion. De plus cet OLM de 37 paires de base linéaire pourrait interagir avec la protéine Ku et donc déclencher le système de réparation des coupures double brin de l'ADN depuis que l'on sait que dans la stratégie « Dbait » un ODN est fonctionnel avec une longueur de plus de 32 pb. Afin de pouvoir incorporer plusieurs sites de liaison reconnus par des facteurs de transcription de manière non chevauchante, il serait nécessaire d'adapter la taille et la forme du leurre moléculaire.

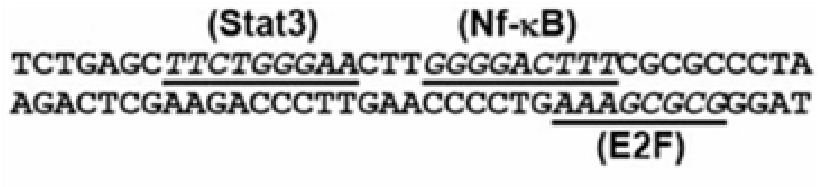


Figure 17. Séquence du leurre moléculaire multisites utilisé par l'équipe de Wang
D'après Gao et coll[126].

Un multiciblage de NF-kB et Ets1 a été reporté dans le but de réduire le risque d'anévrisme aortique abdominal dans un modèle animal (rat, lapin)[127,128]. Comme on peut le voir dans la Figure 18, l'oligonudéoxynucléotide leurre moléculaire de 26 paires de base contient les sites séparés de Ets1 et NF-κB ; cependant, la protéine Ets1 interagit très faiblement avec un seul site consensus du fait de son mécanisme d'autoinhibition.

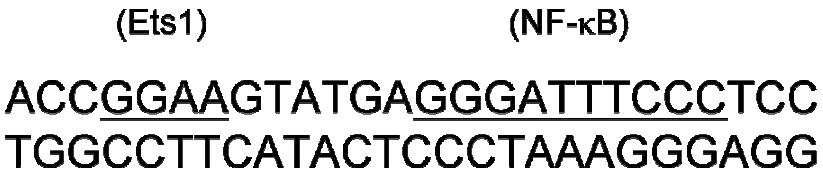


Figure 18. Séquence du leurre moléculaire multisites utilisé par l'équipe de Morishita
D'après Miyake et coll[128].

Afin de réaliser un multiciblage protéique par la stratégie du leurre moléculaire, il est nécessaire de concevoir une nouvelle molécule d'ADN permettant la fixation de plusieurs protéines et si possible en répondant aux difficultés liées aux problèmes rencontrés en thérapie

génique. Pour cela, nous avons développé une molécule d'ADN non pas linéaire mais circulaire appelé minicercle d'ADN. Dans la suite, je ferai un bilan des connaissances sur les petits ADN de forme circulaire afin de comprendre leur intérêt aussi bien dans des études académiques que pour des applications thérapeutiques.

III) Les minicercles d'ADN

III-A) Minicercles

Il a été observé que la transfection de plasmide augmente quand la taille du plasmide diminue (de 52500 pb à 2900 pb)[180] et de 5000 à 650 pb[181]. L'ADN circulaire est mieux transfecté par la PEI que l'ADN linéaire[182]. Il a également été montré que l'ADN circulaire a un meilleur coefficient de diffusion que l'ADN linéaire[183]. Enfin, l'ADN circulaire par définition ne présente pas d'extrémités franches ressemblant aux cassures doubles brin contrairement à des ADN thérapeutiques linéaires de taille dépassant une trentaine de pb. Ces résultats indiquent que l'ADN circulaire sous forme de minicercle serait une molécule utilisable en thérapie génique (délivrance et trafic intracellulaire). L'équipe de Zechiedrich aux Etats Unis a commencé à exploiter des minicercles d'ADN de taille comprise entre 300 et 1000 pb pour bénéficier de leur meilleur stabilité et de leurs propriétés en thérapie génique[184,185]. Notamment, cette équipe a observé que des minicercles d'ADN double brin d'environ 100 à 400 paires de bases ne sont pas dégradés lors d'une délivrance par nébulisation[184], contrairement à des plasmides qui sont dégradés[186,187]. Ces résultats suggèrent que des minicercles d'ADN pourraient présenter des avantages dans la stratégie du leurre moléculaire.

1) Minicercles et nanotechnologies de l'ADN

Les acides nucléiques peuvent être considéré comme des polymères pouvant former de multiples liaisons réversibles ce qui en font un matériau idéal à partir duquel des objets de taille nanométrique peuvent être construits. Des minicrecles ont été utilisés pour la construction de nanomachines comme la molécule de rotaxane[188], de nanoarchitectures asssemblées via des structure en quadruplexe[189], des ARN en épingle à cheveux[190] ayant de nouvelles fonctions moléculaires.

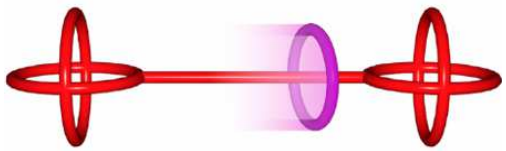


Figure 19. Schéma de la molécule rotaxane
D'après Lohmann et coll[191]

2) Les boucles d'ADN

Des boucles d'ADN (100 pb et plus) dans lesquelles l'acide nucléique est courbé et à la fois contraint se forment au cours de processus cellulaires comme la régulation de l'expression des gènes dans des bactéries et les organismes eucaryotes[192,193]. Dans le cas du répresseur du lactose[194,195] chez *E. coli* et even skipped chez la drosophile[196], la séquence promotrice reconnue et liée à l'ARN polymérase est localisée dans des boucles de répression. Notamment, des études ont permis de mieux comprendre la relation entre le stress de la torsion induite pour ces boucles de répression et l'activité des ARN polymérases en mesurant le niveau de transcription selon le surenroulement de l'ADN[197–201]. Lionberger et Meyhöfer en ont conclu que la formation d'une boucle est suffisante pour empêcher l'élongation par la T7 RNA polymérase[202]. Un autre exemple décrit par Singh et Hampsey[203] décrit la formation d'une boucle d'ADN d'environ 1000 pb lors de la transcription de gènes. Cette boucle est formée grâce à la juxtaposition des régions promotrices et terminatrices du gène transcrit, la boucle étant alors constituée du gène. Les auteurs émettent l'hypothèse que la boucle formée permet la réinitiation de la transcription une fois la transcription terminée par le transfert de l'ARN polymérase II de la région terminatrice au promoteur. L'équipe de Proudfoot[204] décrit dans les organismes eucaryotes la formation de boucles d'ADN dans des régions où l'on trouve des promoteurs bidirectionnels. Selon le sens dans lequel la transcription est initiée par l'ARN polymérase II, le transcrit est un ARN-m ou un ARN non codant.

Pour étudier l'effet d'une courbure sur la transcription, des minicercles de 100 pb environ ont été utilisés. Dans la Figure 20, un minicercle d'ADN (milieu) a été utilisé pour mimer la courbure (flèche verte) causée par un stress de courbure induit par une ARN polymérase sur de l'ADN surenroulé (gauche) ou lié à des répresseurs formant une boucle (droite)[205]. Récemment, Vafabakhsh et Ha se servent également de minicercles pour étudier la flexibilité de l'ADN présente dans les boucles[206]. Ce travail démontre que la flexibilité de l'ADN constitue une information très importante contenue dans la structure de l'ADN pour réguler des processus biologiques comme la transcription.

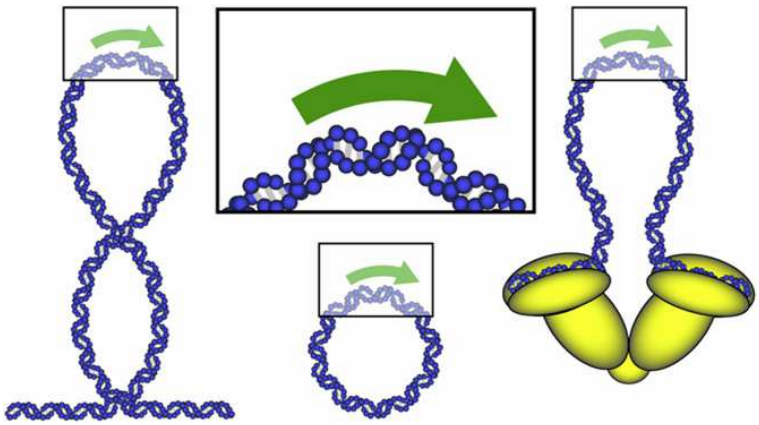


Figure 20. Utilisation d'un minicercle pour étudier l'effet de la courbure et des contraintes toplogiques de l'ADN sur la transcription
D'après Lionberger et Meyhöfer[205]

3) Minicercles formés naturellement dans les cellules

L'existence d'ADN circulaire extra chromosomique, présent dans tous les organismes, y compris chez l'homme, a été mise en évidence[207,208]. Ces ADN circulaires présentent une grande variété de taille puisqu'ils peuvent comporter quelques centaines à plusieurs milliers de paires de base. Ils contiennent des séquences chromosomiques variées, incluant des séquences répétitives et des séquences uniques[208–212]. La formation d'ADN circulaires extra chromosomiques est indépendante de la réplication chromosomique[213] mais il a été montré que sa production peut être augmentée à l'aide d'agents endommageant l'ADN[214–216].

La formation de minicercles d'ADN a également été observée au niveau des séquences télomériques répétées. La linéarité de l'ADN génère plusieurs problèmes dont la nécessité de protéger ses extrémités contre les attaques nucléolytiques et contre une réparation inappropriée[217–219]. Les télomères peuvent adopter plusieurs structures pour ne pas être dégradés[220]. Parmi ces structures, la formation de minicercles d'ADN sb ou db formés de séquences télomériques répétées est un phénomène qui a été observé dans des espèces distantes d'un point de vue phylogénétique (vertébrés, levures, plantes) et donc conservé au cours de l'évolution, il est supposé avoir un rôle important dans la biologie des télomères[221,222].

III-B) Techniques de formation d'un minicercle d'ADN

La formation d'un minicercle est réalisée par circularisation d'un fragment d'ADN linéaire. Le rapprochement des extrémités de ce fragment est d'autant plus difficile que l'ADN est court[223–225]. En effet, la longueur de persistance de l'ADN est de l'ordre de 150 pb (50 nM)[226] c'est-à-dire que l'ADN n'est pas flexible en dessous de cette longueur. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour augmenter la flexibilité de l'ADN et permettre une réaction de circularisation de l'ADN (formation de minicercle) mais les rendements de cette réaction sont faibles. Ces techniques sont résumées ci-dessous.

1) Réaction de circularisation de l'ADN par la ligation enzymatique

La ligation enzymatique *in* vitro de petits duplexes d'ADN linéaires à l'aide d'une ADN ligase est une méthode bien développée pour former des minicercles. En fait, de nombreuses études ont déterminé la flexibilité intrinsèque de l'ADN en quantifiant la proportion de minicercles formés dans la réaction de circularisation de l'ADN. Dans ces études, la concentration en duplexe est faible (ordre du nM ou moins) afin de limiter une réaction intermoléculaire conduisant à la formation de multimères linéaires parasite et donc d'augmenter la réaction intramoléculaire de circularisation. A partir d'expériences électrophorétiques, le rapport entre la quantité de dimères linéaires et de minicercle formés au cours du temps permet de quantifier la flexibilité de l'ADN (facteur J_o). La longueur de persistance de l'ADN est à l'heure actuelle controversée : deux équipes proposent que la longueur est de l'ordre de moins de 100 pb[206,227] alors qu'une autre confirme une longueur de 150 pb[228]. On voit donc que la rigidité intrinsèque de l'ADN limite la formation d'un minicercle et que la compétition entre réaction inter et intramoléculaire empêche une production quantitative de minicercles.

2) Utilisation de tracts d'adénine

Le fait que des fragments d'ADN possédent une courbure intrinsèque a été montré pour la première fois par l'équipe de Englund[229]. La périodicité normale de 10,5 pb par tour d'hélice est plus prononcée pour les dinucléotides AA que pour les autres dinucléotides[230,231] suggérant que l'angle entre les paires de bases dans le dinucléotide AA (8,7°) est plus

important que pour les autres dinucléotides[232]. Ainsi, l'équipe de Choder a synthétisé des fragments d'ADN de 21 pb possédant une série (tract) de 6 adénines séparée par une autre de 5 adénines puis réalisé une ligation enzymatique de ces fragments. A partir de l'analyse des produits obtenus, il est apparu que les tracts d'adénine induisent une courbure de l'ADN. Parmi ces produits se trouvaient 4 minicercles de 105 à 168 pb démontrant la forme courbe de l'ADN contenant des séquences d'adénines (A tract). Par la suite, de nombreuses études ont utilisé la présence de série d'adénines pour former des minicercles d'ADN de petite taille.

3) La circularisation de l'ADN par complémentarité de bases

L'équipe de Vologodskii a développé une technologie appelée DCLCE (DNA Circularization by Long Cohesive Ends) pour former des minicercles de 100 pb[233]. Celle-ci consiste à mélanger 2 oligonucléotides simple brin de N nucléotides, qui peuvent former un duplexe avec N/2 pb et 2 longues extrémités cohésives de N/2 nucléotides. Les extrémités flexibles s'hybrident l'une avec l'autre pour former un cercle double brin contenant deux coupures simple brin. Après ligation enzymatique, un minicercle double brin fermé est obtenu. L'inconvénient majeur de cette technique reste un faible rendement de production du à la compétition de la réaction intermoléculaire obligeant à utiliserune concentration faible d'ADN de l'ordre du nM.

4) Ligation chimique par « click chemistry »

La synthèse de minicercles d'ADN a été réalisée par une une méthode chimique à l'aide d'une cycloaddition azide-alkyne[234] permettant une ligation chimique au niveau des extrémités d'un simple brin d'ADN pré-circularisé par des tracts de thymine. Une hybridation avec le brin complémentaire du cercle simple brin puis sa ligation à l'aide de la même réaction permet la formation d'un minicercle double brin. Une ligation chimique permet donc de circulariser l'ADN mais dans ces expériences l'étape limitante reste la rigidité de l'ADN.

5) Production de minicercle chez la bactérie

L'équipe de Zechiedrich a développé une méthode permettant de synthétiser des minicercles de plus de 300 pb à l'échelle du milligramme[235]. Ces minicercles sont obtenus en

plusieurs étapes. Tout d'abord, un plasmide contenant la séquence du minicercle entre deux sites de recombinaison (Cre-Lox) est produit par clonage. Le plasmide est ensuite utilisé pour transformer des bactéries possédant une recombinase de bactériophage qui joint les 2 sites de recombinaison pour former deux ADN circulaires dont un minicercle. Un des ADN circulaire parasite est éliminé *in vitro* après coupure par un enzyme de restriction qui le linéarise. Lorsque ces minicercles sont produits dans une bactérie déficiente pour une topoisomérase, les cercles produits possèdent différents taux de surenroulement permettant d'avoir des cercles de 300 à 2000 pb avec différents degrés de surenroulements négatifs (après purification de chaque topoisomère).

6) Caractérisation des minicercles formés

L'ADN est caractérisé par 2 paramètres[236] qui correspondent au nombre de torsades (Tw) (pour twist : enroulement des brins sur l'axe hélicoïdal) et au nombre de vrilles (Wr) 'pour writhe : enroulement de l'axe hélicoïdal dans l'espace).

Lorsque l'ADN est sous une forme B, sans contrainte liée à la torsion, le nombre de torsades est égal au nombre de paires de bases divisé par le pas de la double hélice (10,5 pour l'ADN sous forme B). De plus, le nombre de vrilles est égal à 0 car il n'y a pas de contrainte de torsion. Dans ce cas, le nombre d'enlacement Lk est égal ou nombre de torsades (Tw).

$$Lk=Tw$$

Lorsque l'ADN est contraint, le nombre de vrilles (Wr) n'est plus égal à 0. Le nombre d'enlacements (Lk) est alors égal à la somme du nombre de torsades (Tw) et du nombre de vrilles (Wr).

$$Lk=Tw+Wr$$

Dans ce cas, l'ADN est surenroulé. Le degré de surenroulement σ est défini par :

$$\sigma = (Lk-Lk_0) / Lk_0$$

où Lk_0 correspond au nombre 'enlacement naturel de l'ADN sous forme B.

Dans un minicercle d'ADN déroulé où la courbure est forte, la double hélice peut présenter des déformations locales de la structure[237]. A l'heure actuelle, aucune structure en solution ou cristalline n'a été reportée principalemnt du fait de la difficulté de produire des

quantités suffisantes de minicercle. La plupart des études portant sur les déformations induites dans un minicercle d'ADN ont été réalisées par cryomicroscopie à transmission électronique, digestion enzymatique et modélisation par dynamique moléculaire Les déformations connues sont :

1) des kinks (courbure serrée) où l'appariement des bases est préservé mais il y a diminution du stacking des bases. Cette anomalie a été suggérée par Klug[238] et a été retrouvée dans de nombreux complexes ADN-protéines[239–241] et même dans des minicercles de taille inférieure à 80 pb[233].

2) Une ouverture des paires de bases qui est déduite de la sensibilité du minicercle à des nucléases et d'études par dynamique moléculaire.

Projet de thèse

Mon projet de thèse porte sur la stratégie du leurre moléculaire qui repose sur l'utilisation d'un acide nucléique double brin de forme différente qui une fois introduit dans une cellule par des techniques de thérapie génique va piéger une protéine cible comme un facteur de transcription conduisant à son inhibition.

Ce projet de thèse se divise en deux grandes parties :

1- Développement d'une nouvelle molécule d'acide nucléique pour des applications en thérapie génique concernant la stratégie du leurre moléculaire par multiciblage.

Divers critères ont été retenus afin d'obtenir une nouvelle génération de leurre moléculaire : i) avoir une biostabilité sans introduire de modification chimique. ii) permettre un multiciblage de facteurs de transcription. iii) étendre le ciblage de la stratégie leurre moléculaire à d'autres classes de protéine tout en permettant un multiciblage. iv) être capable de fonctionnaliser chimiquement l'acide nucléique pour différentes applications comme la délivrance cellulaire et l'imagerie.

Nous avons développé une méthode de production de minicercles d'ADN de taille inférieure à 250 paires de base permettant d'étudier ces minicercles d'une part comme nouveau leurre moléculaire et d'autre part comme outil d'étude des interactions ADN-protéines. La méthode de production de minicercles d'ADN est une invention qui fait l'objet d'un brevet en cours de dépôt (22 novembre 2012).

2- Utilisation d'un oligodésoxyribonucléotide leurre moléculaire de type « Dumbell » pour étudier l'effet de la modification de l'ADN par la molécule anticancéreuse cisplatine (lésions) sur l'interaction *in cellulo* ADN/NF-κB (collaboration avec l'équipe de V. Brabec, Olomouc, République Tchèque).

Dans cette étude, nous utilisons pour la première fois à notre connaissance un leurre moléculaire de type « dumbell » contenant un site κB modifié *in vitro* par le cisplatine.

Dans cette approche, la perte d'effet du leurre moléculaire est corrélée à l'inhibition de l'interaction ADN/NF-κB induite par les lésions du cisplatine. Nous montrons *in vitro* par retardement de migration électrophorétique et *in cellulo* par la stratégie du leurre moléculaire chimiquement modifié, que le cisplatine inhibe l'interaction entre NF-κB et son site consensus plus fortement que dans le cas du transplatine qui est l'isomère biologiquement inactif du cisplatine. Ce travail est discuté dans le contexte des mécanismes moléculaires proposés pour comprendre comment le cisplatine diminue l'expression NF-kB dépendante de gènes lors du traitement de cellules cancéreuses par cette molécule antitumorale.

Production *in vitro* de minicercles d'ADN de taille inférieure à 250 paires de base

Article 1 : Résultats brevetés

Production *in vitro* de minicercles d'ADN de taille inférieure à 250 paires de base.

Déclaration d'invention déposée auprès du CNRS.
Dépôt d'un brevet auprès de l'INPI en cours.

Jean-Marc Malinge, Thomas Thibault, Chantal Pichon, Patrick Midoux

Nous avons vu dans la partie introductive de ce manuscrit que la stratégie du leurre moléculaire pourrait être améliorée notamment si on lui confére la capacité de multiciblage de protéines comme des facteurs de transcription. Le travail de thèse a donc essentiellement porté sur le développement d'un nouveau type d'acide nucléique sous forme de minicercle d'ADN en double brin. Un premier intérêt de cette molécule est qu'elle ne possède pas d'extrémité libre ce qui la rend insensible aux exonucléases avec pour conséquence de pouvoir l'utiliser probablement en thérapie génique sous une forme phosphodiester donc sans modification chimique. Une forme circulaire présente aussi l'avantage de pouvoir utiliser un minicercle comme plateforme modulable pour optimiser les interactions avec les protéines ciblées. Cette optimisation peut être faite si nous sommes capables de produire des minicercles contenant des séquences variables (nature et position). Etant donné qu'aucune méthode versatile et quantitative de production de minicercle n'a été décrite, nous avons développé une nouvelle méthode de production de minicercles d'ADN.

Grâce à cette méthode, des minicercles d'ADN de taille inférieure à 250 pb ont été produits par ligation enzymatique *in vitro* de sorte à pouvoir obtenir une quantité d'ADN de l'ordre de plusieurs centaines de microgrammes au milligramme dans une réaction « one pot ». La stratégie de circularisation décrite consiste à utiliser une protéine de courbure de l'ADN associée à une déformation de l'ADN linéaire de départ qui donnera finalement un minicercle dans une réaction où la concentration d'ADN est envion 100 à 1000 fois plus forte que dans les études précédentes de circularisation (concentration en ADN de l'ordre du micromolaire). Cette stratégie a l'avantage d'utiliser des oligodésoxyribonucléotides de

synthèse sans restriction de choix de séquence et de présenter la possibilité d'incorporer des modifications chimiques pour différentes applications.

La protéine Abf2p (ARS-binding factor 2 protein) utilisée pour courber l'ADN est une protéine mitochondriale de levure impliquée dans la compaction de l'ADN. Elle appartient à la superfamille HMG (High Mobility Group) qui est caractérisée par la présence de 2 boites HMG (Figure 21) formées de trois hélices alpha organisées en forme de L ; ces hélices (1 et 2 principalement) interagissent dans le petit sillon de l'ADN provoquant une courbure vers le grand sillon (Figure 22).

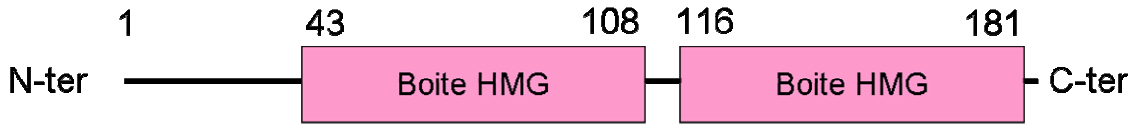


Figure 21. Localisation des boites HMG dans la protéine Abf2p
D'après Diffley et Stillman[242]

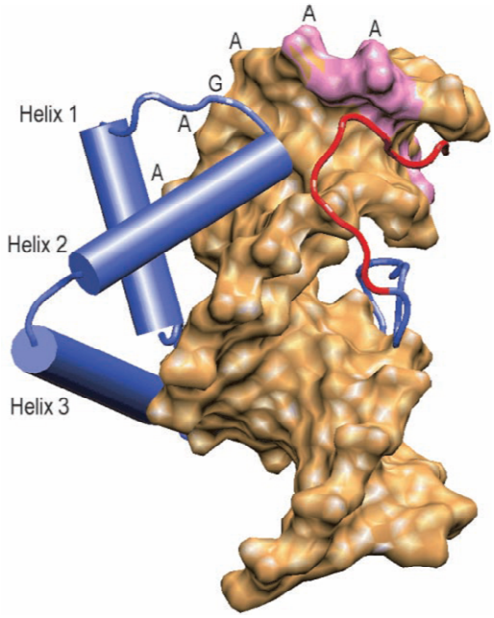


Figure 22. Liaison de la protéine Ste11 possédant une boite HMG à l'ADN
D'après van Beest et coll[243]

Il est également possible d'incorporer dans les minicercles produits par cette méthode des bases modifiées, ce qui permet de fonctionnaliser chimiquement les minicercles. Il est ainsi possible d'intégrer des fluorophores pour visualiser le cercle dans des cellules par microscopie confocale ou par cytométrie en flux. L'incorporation de bases 8-Oxo-Guanine pourrait permettre par exemple de leurrer un système de réparation de l'ADN dans la cellule. Grâce à l'incorporation d'un intercallant lors de la circularisation, il est également possible de

contrôler le degré de surenroulement du minicercle. Pour illustrer la versatilité de la méthode, des minicercles contenant différentes séquences de fixation de facteur de transcription ou des modifications chimiques, ont été produits puis étudiés en interaction avec différentes protéines. Notamment nous avons porté notre attention sur le facteur de transcription NF-κB $(p50)_2$ et montré qu'il interagit bien avec un minicercle, ce qui représente une condition nécessaire pour une application d'un minicercle comme leurre moléculaire.

ABSTRACT

DNA minicircles are nano-objects of great interest both for basic research studies and for multiple applications in nanotechnology and nucleic acids medicine. The method presented here is related to the production of double-stranded DNA minicircles of size down to about 250 base pairs from synthetic DNA oligonucleotides in a cell free system. In the present invention, DNA substrate used in a ligase-mediated circularization reaction in the presence of a bending protein, was designed by introducing a DNA structure perturbation which enables DNA circularization reaction at elevated DNA concentration to yield finally a minicircle devoid of the initial DNA structural perturbation. This method is characterized by its versatility enabling DNA minicircle production with sequence of any base composition and position as exemplified with the construction of a 95 base pairs double-stranded DNA minicircle. The method also gives the opportunity to prepare DNA minicircles containing a variety of site-specifically placed chemical modifications allowing functionalization of minicircles for biological and biochemical applications. In our method is also included the generation of DNA minicircle endowed with supercoiling. Altogether, our method enables the production of a variety of minicircles that can differ according to a combination of sequence and chemical modifications that could give rise to new type of nucleic acid platform for multiple protein interactions. This new method which provides amounts of material, opens now the possibility to study minicircles as biologically active nucleic acids for proteins targeting by the decoy strategy.

INTRODUCTION

Small DNA minicircles of less than about 250 base pairs (bp) in length provide a convenient molecule for both fundamental studies and application purpose. DNA minicircles either double- or single-stranded are used as nanoscale building objects in structural DNA nanotechnology, a growing field of research (1, 2). DNA Minicircles have been used as scaffold to assemble nanoarchitectures after the incorporation of G-quadruplexes (3), RNA hairpin (4) or chemically functionalized oligonucleotide (5) leading to the possibility to create molecular devices with a broad range of functions. The ability to create a controlled bend in a structural material is an important feature that has been exploited for nanomachine building (6). The biological application of DNA nanostructures is a very young field of research that necessitates amount of DNA building material (7). Minicircles as building blocks have been produced in small amount limiting their use to biophysical studies. It is therefore challenging to develop method for quantitative production of DNA minicircles not only for DNA nanostructure assemblage but also for their own applications as new biologically active nucleic acid molecule. Notably, it is well recognized that reducing the size of DNA is beneficial in gene therapy approaches by improving cell DNA transfection and trafficking (8, 9); therefore small minicircles of length down to about 250 base pairs need to be investigated for their potential activity in regulation of gene expression for instance by targeting DNA binding protein by the so called “decoy strategy”. The delivery of circular nucleic acids in biological fluid is also known to present several advantages as an increased stability thanks to resistance to exonucleases.

DNA minicircles are naturally bent which offers the advantage to mimics DNA loops formed during essential DNA-dependent transactions (transcription, replication, recombination) (10, 11). DNA supercoiling is another relevant structural characteristic playing a role in DNA-dependent cellular processes (12, 13). The absence of free DNA ends in minicircles relates to the capacity for the double helix to be torsionally stressed enabling to investigate higher order DNA structure of biological relevance. A poorly solved but fundamental problem is also the role of DNA constraints on the binding and activity of proteins implicated in the DNA metabolism (transcription factor and repair proteins for instance). A majority of protein-DNA interactions studies have been carried out with unconstrained linear DNA substrates as a consequence of the difficulty to build DNA minicircles containing various sequence and/or chemical modifications for specific protein binding. Thus DNA minicircle is a molecule of great importance to improve our knowledge

on the molecular basis linking DNA topology, bending and the assemblage of nucleoprotein complexes.

Construction of minicircles from short linear DNA fragments down to 250 bp containing random sequences is difficult because such DNA length is in the vicinity of the persistent length (about 150 bp/50 nm, the persistence length being a measure to characterize the stiffness regarding bending of the helix axis) (14). As a consequence the yield of the monomolecular reaction, i.e. the circularization of DNA by closure of both DNA ends by enzymatic ligation, is weak as compared to that of the competitive bi and multimolecular reactions between DNA double helix even at low range of DNA concentration (less than 1 nM).

To date two in vitro methods have been reported for circularization of linear DNA fragments of less than 250 pb, i. e. ligation of DNA fragments in the absence or in the presence of a bending protein. In the absence of bending protein, slight increase in the efficiency of the cyclization reaction can be achieved by specific sequence endowed with intrinsic bendability (so called A tracts) with the drawback to lose the possibility to incorporate freely DNA sequence of interest such as consensus sequence for protein recognition (15). Another in vitro strategy has been employed in the absence of bending protein to increase the overall yield of minicircle formation but a low DNA concentration used in the cyclization reaction and labor intensive purifications steps remain important drawbacks for minicircle quantitative production (16). In the presence of a DNA bending protein, random-sequence DNA fragments were generally used in DNA ligase-dependent circularization reaction to determine the ability of various architectural proteins to induce DNA bending/flexibility and the nM range concentration of linear DNA substrate is a limitation towards the possibility of minicircle production (17-19). Moreover in both methods, there is no possibility to control the superhelicity of DNA minicircle.

Generation of DNA minicircles containing supercoiling has been described through construction and use of designed plasmids for in vivo site specific recombination (20). This approach allowed production of minicircle in milligram quantities for DNA size of about 300 bp and more but the versatility of this approach for introducing customized DNA sequences is limited by the labor intensive method and the likelihood of sequence-dependent unpredictable negative effect on the recombination efficiency; also the direct production of chemically functionalized minicircles is impossible as a consequence to in cellulo minicircle production. Finally production of short DNA fragment smaller than about 300 bp is inefficient.

Although the use of minicircles is promising for various in vitro applications, a versatile method of minicircle production with customized DNA sequences in the presence or not of chemical functionalities is not yet available. Production of large quantities of material is another important criterion to be fulfilled notably for future biological investigations of minicircles activity.

To overcome the limitations as depicted above, the present invention discloses a method that allows simple, rapid and versatile production of high quality form of DNA minicircles of different length with several hundred micrograms to milligrams amounts of final product in a one pot reaction without extensive purification steps using commercially available oligodeoxynucleotides. The versatility of this method will be used here to produce minicircles containing sequences for DNA binding protein or to functionalize them with chemical groups introducing new properties as described below.

MATERIAL AND METHODS

Oligodeoxynucleotides used here were synthesized by phosphoramidite method with or without modifications as indicated in the text and were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). Proteinase K, T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase and T5 exonuclease were purchased from Fermentas and T5 exonuclease was from New England Biolabs. Full length NF-κB p50 and Fpg were bought from Promega and New England Biolabs, respectively. Bal31 nuclease and streptavidin were respectively from New England Biolabs and Sigma-Aldrich and 700 bp ladder DNA molecular weight marker was from Fermentas.

p-ET15 b derived vector containing Abf2p gene was kindly provided by F. Culard (Centre de biophysique moléculaire, CNRS, Orléans, France); the plasmid was used for transformation of BL21 (DE3) pLysS (Novagen) with 34 µg/ml of chloramphenicol and 30 µg/ml of kanamycin. The strain transformed was grown at 37°C with shaking to an A600 of 0.5. The culture was induced with isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (Calbiochem) at a final concentration of 100 µM for 6 h. After centrifugation, the cells were resuspended in a sonication buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol) supplemented with protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich) and 100 mM phenylmethylsulfonylfluoride (Pierce) and then sonicated. All purification steps were performed at 4°C. The lysate obtained after centrifugation of the extract was applied to a nickel agarose column (Qiagen) and histidine-tagged Abf2p was eluted with buffer containing 100 mM imidazole at a flow rate of 1 ml/min. Abf2p was concentrated on an Amicon Ultra-4

10K (Millipore) and was stored at -70°C in a buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 5% glycerol. Protein concentration was determined by using the Bradford reagent (Bio-Rad) using BSA as a standard. The final concentration of the protein was 3 mg/ml. The purity was estimated as >95% on sodium dodecyl sulfate-acrylamide gel using EZBlue gel staining reagent (Sigma).

Circularization reaction

Method of production of double-stranded closed relaxed minicircle:

Preparation of each overlapping DNA templates were performed by mixing equimolar quantities of complementary single-stranded oligonucleotides in buffer containing 10 mM Tris-HCl and 25 mM NaCl, pH 7.5 at a concentration of 40 µM (expressed in mole of overlapping duplex); hybridization was carried out by heating the oligonucleotide mixture at 80°C followed by slow cooling at a temperature of 15°C in a water bath.

A standard reaction of circularization was carried out by adding the overlapping nicked duplex at a final concentration of 2 µM in a buffer containing 40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP and 5% glycerol, pH 7.8. Abf2p was next added to a final concentration of 2 µM followed by T4 DNA ligase (20 units); the reaction mixture was then incubated at 20°C for 1 h followed by the addition of proteinase K (0.3 units); after an incubation time of 30 min at 55°C, exonuclease T5 was added (200 units) and incubation lasted for 30 min at 37°C; finally a second digestion step by proteinase K was carried out. The minicircle was then precipitated by addition of AcONH4 to a final concentration of 2.5 M and addition of 2 volumes of cold ethanol. After centrifugation at 14000 rpm for 15 min, the supernatant was discarded and the pellet washed by addition of 70 % ethanol followed by centrifugation. The pellet was then resuspended in buffer containing 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5 at a concentration of about 200 µg/ml in DNA minicircle; the optical density of DNA minicircle sample was measured for concentration determination and to control that the A260/A280 ratio was larger than 1.8 corresponding to high quality DNA. The overall yield for a one pot production of pure DNA minicircle is 30 % (50 µg of a 95 bp minicircle produced per ml of circularization reaction with an initial amount of input DNA of 150 µg). Note that DNA minicircle purification can also be performed using silica bead DNA gel extraction kit according to the manual instructions (Thermo Scientific).

Production of supercoiled DNA minicircle through the formation of nicked circular minicircle intermediate:

The standard reaction of circularization can be used to produce nicked circular minicircle when an unphosphorylated 5' end is present on either strand of the overlapping duplex (Figure 5); in such a case, circularization reaction occurs by sealing DNA ends of one strand to form a minicircle containing a single nick in the other. The reaction mixture was then sequentially incubated with proteinase K (0.3 units, 30 min at 55°C), T4 polynucleotide kinase with 1 mM ATP (200 units, 30 min at 37°C) and finally with T4 DNA ligase (100 units, 1 h at 20°C) in the absence or in the presence of increasing concentrations of ethidium bromide (Sigma-Aldrich) as indicated in the text. Ethidium bromide was then removed by butanol extraction. The purification steps were the same as described above and the overall yield of the reaction was 20%.

As shown in pathway 1 of Figure 5, the single nicked circular DNA was also treated with exonuclease III (3200 units, 2h at 37°C) allowing complete digestion of nicked strand to yield single-stranded minicircle which was then purified using silica bead DNA gel extraction kit (Thermo Scientific) (final yield of 10 % as calculated from the starting double-stranded minicircle form); next, the single-stranded minicircle was allowed to hybridize in buffer containing 10 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 7.5 with the complementary strand of 95 nt or with both complementary strands of 40 and 55 nt yielding respectively single-nicked minicircle or double-nicked minicircle.

Gel electrophoresis analysis:

Products formed in the circularization reaction were analyzed under native polyacrylamide gel electrophoresis. 130 ng of input DNA was loaded on a 5% native polyacrylamide gel (19:1, acrylamide:bisacrylamide (w/w), 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA, pH 8.3) followed by migration at 12.5 V/cm for 90 min. After gel staining by SYBR Green (Invitrogen), the gel was imaged with a Typhoon Trio (GE Healthcare) and quantification of the gel bands was performed by ImageQuant software 5.1. Notice that in native polyacrylamide gel shown in Figure 3, the DNA was visualized by fluorescence and thus molar ratio of starting linear

duplex over oligomers was calculated taking into account that band intensity is increased as a function of the oligomer length. Electrophoresis of minicircle was also performed as above with the additional presence of 10 mM MgCl2 in order to separate minicircle topoisomers.

Minicircles generated in the circularization reaction were also analyzed on 8% denaturating polyacrylamide gel electrophoresis (19:1, acrylamide:bisacrylamide; 8 M urea; 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA, pH 8.3); DNA samples in formamide were heat denaturated and 65 ng of DNA per sample was loaded on denaturating gel and electrophoresed at 18 watts for 90 min. After gel staining by SYBR Green (Invitrogen), the gel was imaged with a Typhoon Trio (GE Healthcare) and quantification of the gel bands was performed by ImageQuant software 5.1.

Reaction of Fpg (8 units) with the 95 bp minicircle containing one or two 8-oxoguanine residues (0.2 µM) was carried out in buffer containing 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.6 for one hour at 37°C. After protein inactivation by heating at 60°C during 10 min, the reaction products were analyzed on denaturating gel electrophoresis as indicated above.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA was used for interaction studies of DNA minicircles with DNA binding proteins used herein. Abf2p was incubated with minicircle (10 ng) as a function of the concentration as indicated in the text in buffer containing 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol pH 7.6 for 10 min. After adding gel loading buffer, reaction mixture was loaded on a 5% native polyacrylamide gel (19:1, acrylamide:bisacrylamide (w/w); 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA, pH 8.3). Gel was electrophoresed for 1h. NF-κB p50/p50 was incubated with minicircle (10 ng) as a function of the concentration as indicated in the text in buffer containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 3 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 2% glycerol, 50 µg/ml acetylated BSA, pH 7.5 for 30 min at 4°C. After adding gel loading buffer, reaction mixture was loaded on a native 5% polyacrylamide gel (19:1, acrylamide:bisacrylamide (w/w); 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA, pH 8.3). Gel was electrophoresed for 1h. Streptavidin (Sigma-Aldrich) was incubated with DNA minicircle (10 ng) as a function of the concentration as indicated in the text with buffer containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 3 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 2% glycerol, 50 µg/ml acetylated BSA, pH 7.5. After addition of loading buffer, reaction mixture was loaded on a 5% polyacrylamide gel (19:1, acrylamide:bisacrylamide (w/w); 45 mM Tris borate, 0.5 mM EDTA, pH 8.3). Gel was

electrophoresed for 1 h and staining was carried out by incubation of the gel in SYBR Green for 20 min. The gel was finally exposed to a Typhoon phosphoimager and the fraction bound (intensity of the bound complex/total intensity) was determined by ImageQuant 5.1 software.

RESULTS AND DISCUSSION:

Strategy for DNA minicircles production

In the range of the DNA persistence length (less than 250 bp), the intrinsic bendability of starting linear DNA is too weak for efficient circularization reaction by enzymatic ligation and the prevalence of the intermolecular reaction (DNA linear multimers formation) needs to perform reaction at very low DNA concentrations in the nM range limiting yields of production to ng quantities. We took advantage of several biophysical properties of DNA and proteins, to design a reaction allowing efficient circularization of DNA by enzymatic ligation at DNA concentrations at least two orders of magnitude greater than previously used. In the present invention, a DNA structure perturbation was introduced within the linear template DNA substrate to be circularized prior to the circularization reaction; such structure potentiates the DNA bending activity of a protein that in turn enables efficient ligase-mediated circularization reaction at elevated DNA concentration for production of DNA minicircle devoid of the initial DNA structure perturbation. The strategy for minicircle production is outlined in Figure 1 and the main steps are summarized as follows:

i) we chose to exploit the DNA bending ability of a yeast HMG box family protein, the mitochondrial protein Abf2p (ARS binding factor 2); Abf2p is a monomeric protein that binds DNA in a largely sequence-independent manner inducing large bending by about 80° and covering about 25 bp of DNA (21). Especially, this protein has been selected here for the ease and robustness of production and its ability to be active in DNA circularization reactions containing different modifications including those induced by chemical groups as exemplified further.

ii) The best commercially available chemical approach of oligonucleotide synthesis which is the solid-phase phosphoramidite method, enables production of single-stranded oligonucleotides in the range of 60 nucleotides (nt) with good yield and purity. Therefore, our method consisted in assembling appropriate overlapping oligonucleotides in order to form a

starting blunt-ended DNA template of interest containing internal nicks (single-stranded cuts in one strand). The introduction of DNA structure perturbation through nicks is known to help to induce some flexibility of the double helix (22, 23); predisposing the DNA to flexibility is a necessary condition in our strategy for efficient ligase-mediated DNA circularization in the presence of a bending protein for minicircle production.

iii) DNA ligase activity has been extensively studied and was shown to be unaffected by histone protein bound to nicked DNA substrate (24, 25); this indicates that the architectural protein Abf2p should not compromise significantly ligase activity of nicked DNA; moreover ligase such as T4 DNA ligase is commercially available and cheap.

iiii) Sequential enzymatic digestion of DNA contaminants (unproductive linear DNA, linear oligomers and nicked circular minicircle) and of proteins from the circularization reaction mixture containing the minicircle of interest was carried out by an exonuclease and a protease, respectively. Pure minicircle of interest is recovered by ethanol precipitation giving rise to a one pot DNA circularization reaction without further purification steps.

Method for DNA minicircles production:

The linear nicked blunt-ended duplex of 95 bp was formed by mixing two appropriate overlapping oligonucleotides with two corresponding complementary oligonucleotides (Figure 2, D1). It is important to note that all 5' DNA ends within D1 are phosphorylated in order to perform enzymatic ligation in the conditions as depicted below. As shown in Figure 3, duplex D1 expectedly migrates on native polyacrylamide gel as one band (lane 2) with a mobility close to that of the 100 bp DNA fragment of the molecular weight marker (lane 1, M). After incubation of D1 with T4 DNA ligase in the circularization buffer and in the absence of Abf2p, the starting band decreased and several intense bands of slower mobility appeared (lane 3); as previously described in the literature (26), these bands correspond to linear oligomers of the starting D1 duplex, the most abundant oligomers being a dimer (refer to the corresponding migration with the DNA marker of lane 1). This result demonstrates that at high DNA concentration such as used here (2 µM in duplex D1) only the contaminating intermolecular ligation products are formed without generation of minicircle from the nicked linear DNA substrate.

Conversely, when the same ligation reaction is carried out in the presence of the bending protein Abf2p, the reaction products are quite different as shown in lane 4. The band corresponding to the starting duplex D1 is very faint and an intense new band is present which

corresponds to DNA minicircle; remarkably, all the bands corresponding to the contaminating linear oligomers have very weak intensity. The circularization efficiency can be roughly estimated by the ratio between the amount of minicircle over linear dimer; circularization with 95 bp DNA duplex D1 containing nicks yields a high ratio of 8 which is significantly less than ratio of 1.5 obtained in circularization reaction of continuous linear DNA substrate (not shown). Because higher circularization efficiency reflects increased bendability of DNA, we demonstrate here that our nicked DNA substrate is a very efficient input DNA for Abf2p-dependent induced flexibility over DNA duplex with continuity of the sugar-phosphate backbone. Thus the introduction of a nick in each strand separated by an overlapping sequence of 15 base pairs is a relevant finding contributing to high yield of minicircle production at elevated DNA concentration. The DNA flexibility introduced by the presence of strand nicks is deduced from the fact that Abf2p exhibits similar high binding affinity for linear nicked DNA substrate as compared to the corresponding DNA minicircle (Figure 4 A and B), such circular DNA form being well known the preferential DNA substrate for Abf2p (27). Parameters such as the nature of the base pairs flanking the nicks, the length and position of the overlapping sequence, the ligase amount could have a bearing on the efficiency of the circularization reaction. Several combinations of these parameters modulate poorly the circularization reaction. Notably, we found that the yield of the reaction was independent of the length of the overlapping region; indeed, overlapping of 10, 15 and 20 base pairs did not contribute to modulation of the reaction efficiency indicating that nicks induce DNA flexibility that improves efficiency of Abf2p to bind and likely to bend DNA for efficient ligase-mediated DNA circularization reaction.

The mixture is subsequently treated with T5 exonuclease; such enzyme digested efficiently linear double-stranded DNA from 5’-end and exhibits a weaker endonuclease activity with single-stranded DNA. Following ethanol precipitation and gel loading (Figure 3 , lane 5), all linear forms of DNA have been digested by the enzyme on the contrary to the double-stranded closed circular minicircle which is resistant to exonuclease digestion in the absence of free ends as expected. Because the size of circular DNA cannot be established from gel electrophoresis, we next verified that the minicircle product can give back a starting linear 95 bp duplex by taking advantage of the presence of a single HaeIII restriction site specifically formed during the circularization reaction; as shown in lane 6, after incubation of the minicircle with HaeIII, the migration is the same as that of the 95 bp linear duplex showing that the starting product is a 95 bp minicircle. The overall yield for a one pot production of

pure DNA minicircle is 30 % (50 µg of a 95 bp minicircle produced per ml of circularization reaction with an initial amount of input DNA of 150 µg).

To make sure that minicircles were free of nicks following T5 exonuclease activity (covalently closed minicircles), the final 95 bp minicircle was electrophoresed on a denaturating polyacrylamide gel; as shown in Figure 6 (lane 1), DNA minicircle migrates as one band suggesting that it is entirely covalently closed. To control that nicked minicircle intermediates were readily separated on gel under denaturating conditions, we constructed two nicked minicircles intermediates. For that purpose, we used a starting linear DNA (Figure 2, D2) for which only one 5' end is phosphorylated on either strand in order for circularization to take place by sealing DNA ends of only one strand (Figure 5); digestion of the nicked strand of the minicircle yields single-stranded DNA minicircle (Figure 5, pathway 1); equimolar hybridization with the complementary single-stranded ODN of 95 nucleotides (nt) or with both complementary 40 and 55 nt single-stranded oligonucleotides results in the formation of single and double nicked minicircles, respectively. As indicated in Figure 6 (lanes 3 and 4), each nicked circular DNA control migrates as several bands on the denaturating gel: single-stranded oligonucleotides and single-stranded minicircle. This experiment shows that double-stranded DNA minicircle produced by our methodology is devoid of nicked strands.

As shown in Figure 5 (pathway 1), our method can also be used easily for the preparation of single-stranded circular minicircles with similar yield as for double-stranded minicircle production. Thus our method is of interest to construct both circular double- and single-stranded DNA nano-objects.

Abf2p has been shown to introduce negative superhelical turns in plasmid through DNA unwinding (27). To determine whether the minicircle produced in our method is supercoiled or not we used two standard methods, i.e. native gel electrophoresis and sensitivity to the nuclease Bal31. It is known that the presence of magnesium counterions in polyacrylamide gel electrophoresis helps to separate DNA minicircle as a function of the extent of negative supercoiling (28). As shown in Figure 7, 95 bp single nicked minicircle prepared as depicted in pathway 1 of Figure 5, is used as control for unconstraint DNA (lane 2). DNA minicircle prepared in our standard method with Abf2p/DNA molar ratio of 1 (this ratio being defined as the concentration of Abf2p in mole/l over the concentration of DNA duplex in mole/l) exhibits the same migration as that of nicked DNA minicircle (compare lanes 2 and 3 of Figure 7); this result suggests that 95 bp minicircle produced here is relaxed covalently closed circular DNA. To confirm this data, the minicircle was incubated with Bal31 nuclease in

conditions that were previously used to digest constrained but not relaxed DNA minicircle (16, 29). As shown in lane 4 of Figure 7, the DNA minicircle produced in our methodology is resistant to Bal31 confirming the formation of relaxed closed circular DNA and showing that the presence of Abf2p does not induce DNA unwinding in our assay conditions. Note that 95 bp minicircle has an integral number of helical repeats (Lk0) equal to 9 (95 bp divided by 10.54 bp) assuming that helical repeat of the DNA minicircle is 10.54 bp/turn under our experimental conditions (29, 30). Hence covalent closure of the duplex occurs without twisting.

The present strategy can yield minicircles of various sizes depending on the length of the input starting linear overlapping duplex D3, D4, D5 and D6 as shown in Figure 2. Thus minicircles of 84, 95, 116, 158 and 200 bp in length have been produced successfully (Figure 8).

Freedom to choose the nature and position of DNA sequences present in a DNA minicircle:

The data reported above were obtained with DNA containing random sequence. To exemplified the versatility of our method regarding the nature and position of DNA sequence used to form minicircles, we next designed DNA minicircle containing consensus sequences for the well known transcription factor NF-κB (Figure 2). The 95 bp minicircles containing one or two κB binding sites (GGGACTTTCC) were generated in the same conditions as depicted above (Figure 2, D7 and D8). The yield of the reaction was unchanged and independent of the position of the κB sequence (in the overlapping region or at the ends of the starting linear nicked DNA). The binding capacity of such DNA minicircles was next tested according to the number of binding site. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed using non labeled DNA minicircles and SYBR green staining which presents the advantage to avoid radioactive labeling thanks to the high amount of minicircles produced by the present method. Example of binding activity of NF-κB with minicircles is shown in Figure 9. First, a relaxed closed minicircle of 95 bp containing a single NF-κB binding site (Figure 9, A) was incubated with increasing concentration of NF-κB and then the reaction mixture was analyzed by EMSA. In the presence of NF-κB protein (p50/p50 homodimer), a retarded band is observed corresponding to the DNA protein complex the intensity of which is increased as a function of protein concentration. When a second binding site is present within the minicircle, we observed the presence of a second more slowly retarded band corresponding to

the binding of a second protein to the minicircle (Figure 9, B). This result shows that short DNA minicircles are capable to attract efficiently DNA binding proteins such as a transcription factor. NF-κB is implicated in cancer through inflammatory pathways stimulation (31). The capability of minicircle to attract specifically target proteins of therapeutic interest is of great interest for therapeutic applications (decoy strategy).

95 bp minicircles encompassing several NF-κB sequences such as the sequence 3NF previously used for enhancement of plasmid DNA nuclear import (32) or a sequence of 6 κB sequences (starting duplexes D9 and D10 as shown in Figure 2); a 95 bp minicircle with a combination of various transcription factor binding sites (NF-κB, ETS1, STAT3) was also produced efficiently using the starting duplex D11. Human telomeric sequence (TTAGGG) can also be part of a 95 bp minicircle using duplex D12; DNA mismatches can also be introduced within minicircles using duplex D13 showing that the method presented here enables preparation of minicircles with DNA distortions.

Thus the overall yield of minicircles production with various sequences as presented herein, is mainly dependent on the presence of nicks in the starting DNA substrates to be circularized together on Abf2p activity. However, we cannot completely rule out that the efficiency of circularization reaction could be modulated by unforeseen DNA sequence effect. In such a case, it is advised to control the annealing of oligonucleotides by simple analysis of duplexes on a native polyacrylamide gel electrophoresis as shown in Figure 3 and/or to increase the amount of Abf2p in the circularization reaction.

Production of minicircles containing chemical functionalities*:*

Commercially available synthetic DNA oligonucleotides are easily functionalized with various base analogs and modifications in the course of solid support synthesis. Here we extended our methodology of circularization to DNA containing several base modifications in order to know whether circularization reaction is permissive for chemically modified oligonucleotides

Minicircle with site-specifically placed natural base modification:

8-oxoguanine

8-oxoguanine is a base modification formed naturally when DNA is subjected to oxidative conditions or ionizing radiations. Such lesion can be repaired by the well known E. coli-derived formamidopyrimidine (Fpg) repair protein which catalyzes the excision of 8-oxoguanine yielding a strand nick in the present assay (33).

95 bp minicircles were produced from input DNA containing either one or two 8-oxoguanine residues within the same strand (Figure 2, D14, D15). The production yield of single or double 8-oxoguanine-modified minicircles was insensitive to the presence of base modification within DNA and the 95 bp minicircle with or without base modification migrates identically as a single band on denaturating PAGE (Figure 10, lanes 1, 3, 5); when the minicircle containing a single base modification is incubated in the presence of Fpg and then the reaction mixture is loaded on denaturating gel, one can observed that the starting band corresponding to the minicircle disappeared to give rise to two new bands (lane 4), co-migrating respectively as a single-stranded minicircle of 95 nt and a linear fragment of 94 nt (as compared to migration of reference products shown in lane 7). Introducing two 8-oxoguanine residues within the same strand of a 95 bp minicircle at position as indicated (Figure 2, D15) yields the expected size of DNA products following Fpg activity as shown in Figure 11 (lane 6). The capability of DNA minicircle bearing several modified bases to attract and to be substrate for repair proteins of therapeutic interest is of great interest for biological applications (decoy based strategy).

Our methodology can be extended to incorporate a variety of modified bases within DNA minicircle with the purpose to trap several target proteins implicated in cancer: repair proteins such as O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with 06-Me-dG modified base; DNA methyltransferase such as cytosine-5 methyltransferase with methylated cytosine modified base.

DNA minicircles with site-specifically placed labels:

Biotin residues:

We first investigated whether the presence of a derivative dT nucleotide with a biotin molecule linked by a spacer to the C5-atom of pyrimidin ring could modulate or not the circularization reaction used in our methodology. After completion of our protocol using

duplex D16 (Figure 2), we obtained pure closed DNA minicircle without decrease in the yield of production. As shown in Figure 11, the minicircle with and without a biotin residue migrated as a single band at the bottom of the EMSA gel (lanes 1 and 2). When minicircles are pre incubated with streptavidin, a slower migrating band is observed only when the minicircle contains a biotin residue showing that streptavidin binds biotin-labeled minicircle (lanes 3 and 4). A second biotin can also be incorporated when placed on the opposite DNA strand (Figure 2, D17); therefore, Abf2p-dependent circularization reaction supports the presence of bulky DNA modifications.

Fluorophores:

Because biotin itself is a relatively small residue, we next investigated whether a larger molecule such as fluorophore could be used as label in place of biotin. Using input cyanine 3 or carboxyfluorescein modified-DNA (Figure 2, D18, D19, D20, D21) our methodology generates in good amount 95 bp minicircle site-specifically labeled by cyanine 3 or carboxyfluorescein; as deduced from spectrophotometry measurement, the ratio of fluorophore over nucleotide confirmed that one or two fluorophores are present per minicircle.

Minicircle labeling presents several applications:

- biotinylated minicircles can be linked to various streptavidin coated materials such as i) streptavidin agarose beads for the search of protein binding within cell-free extract ii) streptavidin coated surface such as microplate or sensor chip iii) quantum dots or antibodies through streptavidin interaction iiii) streptavidin-coated magnetic particles for molecular biology and gene therapy applications
- Fluorescent labeling of minicircles can be used in various studies such as i) structural investigation of minicircle in the presence or absence of proteins through Förster resonance energy transfer (FRET) thanks to appropriately placed chromophores ii) cell uptake and trafficking of minicircles for biological applications
- DNA minicircle containing amino-modifier dT could enable site specifically functionalization of the minicircle by various chemical entities (molecular labeling, peptides, polymers) thanks to the well known N-hydroxysuccinimide coupling

reaction. Such functionalizations could endow minicircles with new important properties for biological applications such as cell targeting, cell delivery and cell trafficking.

Production of supercoiled DNA minicircles through direct formation of a singly nicked DNA minicircle intermediate:

Religation of nicked circular DNA plasmid in the presence of an intercalating drug such as ethidium bromide (EtBr) is known to introduce unwinding by decreasing the twist (Tw) value of dinucleotide steps (34). Sealing of the nick by enzymatic ligation will fix the unwinding and removal of EtBr chemical induces an increase in the twist value and therefore in the number of base pairs per helix turn. As a consequence the circular DNA is underwound with torsional stress and the linking number Lk of the minicircle decreases (Lk being the number of times that each DNA strand winds around the other in circular DNA). Changes in the linking number (ΔLk) is the difference between Lk and Lk0 (the number of double helical turns in the original linear molecule); variation in linking number generally induces apparition of supercoiling or writhe (Wr), i.e. an helix coiling upon itself, allowing formation of usually one lowest energically shape of circle called a topoisomer, each topoisomer of the same molecule migrating separately on gel electrophoresis. Such geometric variations of circular DNA are summarized by the following equation: $\Delta Lk=\Delta Tw+\Delta Wr$ where any change in linking number relates to a change in the writhe and/or the twist and vice versa. In the present situation, the decrease in Lk yields a negative value for ΔLk corresponding to a situation where the molecule is underwound with the possibility of negative supercoiling formation.

With the aim to take advantage of our methodology to produce supercoiled double-stranded DNA minicircles in a one pot reaction, we first assemble a reaction mixture yielding single nicked double-stranded minicircle intermediate as shown in Figure 5. At that point, a critical step is to inactivate the DNA binding activity of Abf2p to avoid interference on the distortions of nicked minicircle before religation in the absence or in the presence of intercalating drug; our method here used proteinase K in such amount quantity that both Abf2p and ligase proteins are digested in addition to proteinase K thanks to its self digestion activity. As shown in pathway 2 of Figure 5, a singly nicked DNA minicircle free of torsional

constraints (relaxed form) is formed. To prepare covalently closed minicircle, it is necessary to first phosphorylate the free 5' OH end at the terminal nick by a kinase in order to reseal the nick by a ligase. These enzymes are successfully added sequentially step by step with optimal activity showing absence of any residual proteinase K activity. As shown in lane 2 of Figure 12, pure closed minicircle is produced and comigration with relaxed nicked minicircle (lane 1) indicates that it is indeed relaxed (no supercoiling).

When the religation of 95 bp single nicked minicircle is carried out in the presence of increasing concentrations of EtBr, we observed an increase in electrophoretic mobility of the 95 bp DNA minicircle (lanes 4 and 6 of Figure 12). At a concentration of 2 µg/ml (lane 4), a new faster migrating band is observed and at the highest concentration tested in intercalating agent two bands are present with a major one migrating as a second faster migrating band (lane 6). Whereas relaxed closed minicircle is completely resistant to Bal31 indicating the absence of helix-destabilized regions (lane 3), the minicircles obtained from ligation reaction in the presence of the intercalating drug are sensitive to Bal31 nuclease as they are completely degraded (lanes 5 and 7). These data are in line with the fact that these two new bands correspond to two topoisomers formed with a 95 bp minicircle.

To our knowledge, this is the first time that supercoiling is observed in a small minicircle of 95 bp. Thus our method can yield in a one pot reaction supercoiled form of minicircle; the first topoisomer ($\Delta Lk=-1$) has a negative superhelical density of 0.1 which is slightly more elevated than that expected in physiological conditions (about 0.08) (35) and thus can be used to study the effect of supercoiling in bent DNA molecule on DNA binding activity of proteins. As exemplified here, the first topoisomer is produced as a single product; however, it is likely that a purification step of several topoisomers will be necessary for further studies using DNA of different length and sequence.

CONCLUSION

The methodology reported here enables the quantitative production of a wealth of various DNA minicircles that contain any DNA sequences with or without chemical base modifications for several applications. The use of synthetic oligonucleotides in the present method has several advantages: they are easily manufactured with large scale and low cost and they show the ability to carry an unlimited combination of sequence information with or without chemical modifications.

As exemplified here, minicircles support the binding or the activity of different class of protein (transcription factor, repair protein). Consequently, they can be used as decoy nucleic acids to titrate target proteins in cells including but not limited to transcription factors, telomeric proteins, repair proteins, DNA methylase, architectural proteins. Because DNA minicircles cannot be replicated in cells, the inhibition of a target protein (decoy effect) is transient which may be advantageous in some applications where a drug like approach to gene inhibition is useful but a drawback when permanent transformations is desired. In such a case, irreversible trapping of a target protein should be an advantage to postpown the negative effect of the minicircle by including chemical functionalities allowing DNA-protein covalent linkage. The delivery of circular nucleic acids in biological fluid is also known to present several advantages as an increased stability thanks to resistance to exonucleases. The size of the minicircles also authorizes the presence of several protein binding sites opening the way to the building of nucleic acids platforms with multiple proteins interactions.

In non viral gene therapy, DNA diffusion in the cytoplasm and nuclear import are believed to be rate limiting determinants for transgene delivery which is performed with the use of circular supercoiled plasmid DNA (32, 36). Studies of DNA mobility in cells have been carried out as a function of the DNA size using linear DNA which does not mimic circular DNA as a consequence to DNA ends effects (37). DNA minicircles could be used as a model in studies of therapeutic nucleic acids trafficking in cells such as plasmid used in gene therapy as a function of several DNA parameters (sequence, topology).

Finally our methodology also enabled the production of relaxed as well as supercoiled DNA minicircles providing a convenient and biologically relevant model system to study the mutual influence of DNA topology and bending.

REFERENCES

1- Seeman, N.C. (2010) Nanomaterials based on DNA. Annu. Rev. Biochem. 79, 65-87.

2- Pinheiro, A.V., Han, D., Shih, W.M. and Yan, H. (2011) Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. Nat. Nanotechnol. 6, 763-772.

3- Gonçalves, D.P.N., Schmidt, T.L., Martin, B.K. and Heckel, A. (2010) DNA minicircles connected via G-quadruplex interaction modules Small 6, 1347-1352.

4- Mayer, G., Ackermann, D., Kuhn, N. and Famulok, M. (2008) Construction of DNA architectures with RNA hairpin. Angewandte Chemie, 47, 971-973.

5- Rasched, G., Ackermann, D., Schmidt, T.L., Broekmann, P., Heckel, A. and Famulok, M. (2008) DNA minicircles with gaps for versatile functionalization. Angewandte Chemie, 47, 967-970.

6- Ackermann, D., Schmidt, T.L., Hannam, J.S., Purohit, C.S., Heckel, A. and Famulok, M. (2010) A double-stranded DNA rotaxane. Nature Nanotechnology 5, 436-442.

7- Schuller, V.J., Heidegger, S., Sandholzer, N., Nickels, P.C., Suhartha, N.A., Endres, S., Bourquin, C. and Liedl, T. (2011) Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA Origami structures ACS Nano, 5, 9696-9702.

8- Lukacs, G.L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N. and Verkman, A.S. (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus J. Biol. Chem. 275, 1625-1629.

9- Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J. and Pitard, B. (1999) Nucleic Acids Res. 27, 3792-3798.

10- Finzi, L., and Dunlap, D.D. (2010) Single molecule approaches to, probe structure, kinetics, and thermodynamics of nucleoprotein complexes that regulate transcription. J. Biol. Chem. 285, 18973-18978.

11- Moabbi, A.M., Agarwal, N., El Kaderi, B. and Ansari, A. (2012) Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 109, 8505-8510.

12- Kanaar, R. and Cozzarelli, N.R. (1992) Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions. Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 369-379.

13- Baranello, L., Levens, D., Gupta, A. and Konzine, F. (2012) The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. Biochim. Biophys. Acta 1819, 632-638.

14- Hagermann, P.J. (1988) Flexibility of DNA. Ann. Rev. Biophys. Biochem. 17, 265-286.

15- Zhang, Y. and Crothers, D.M. (2003) High-throughput approach for detection of DNA bending and flexibility based on cyclization Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100, 3161-3166.

16- Du, Q., Kotlyar, A. and Vologodskii, A. (2008) Kinking the double helix by bending deformation Nucleic Acids Res. 36, 1120-1128.

17- Paull, T.T., Haykinson, M.J. and Johnson, R.C. (1993) The nonspecific DNA-binding and –bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures Genes and dev. 7, 1521-1534.

18- Czapla, L., Peters, J.P., Rueter, E.M., Olson, W.K. and Maher III, L.J. (2011) Understanding apparent DNA flexibility enhancement by HU and HMGB architectural proteins J. Mol. Biol. 409, 278-289.

19- Teter, B., Goodman, S.D. and Galas, D.J. (2000) DNA bending and twisting properties of integration host factor determined by DNA cyclization Plasmid 43, 73-84.

20- Fogg, J.M., Kolmakova, N., Rees, I., Magonov, S., Hansma, H., Perona, J.J., Zechiedrich, E.L. (2006) Exploring writhe in supercoiled minicircle DNA J. Phys. Condens. Matter 18, S145-S159.

21- Diffley, J.F.X. and Stillman, B. (1991) A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7864-7868.

22- Furrer, P., Bednar, J., Stasiak, A.Z., Ktritch, V., Michoud, D., Stasiak, A. and Dubochet, J. (1997) Opposite effect of counterions on the persistence length of nicked and non-nicked DNA J. Mol. Biol. 266, 711-721.

23- Protozanova, E., Yakovchuk, P. and Frank-Kamenetskii, M.D. (2004) Stacked-unstacked equilibrium at the nick site of DNA J. Mol. Biol. 342, 775-785.

24- Doherty, A.J. and Suh, S.W. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases (2000) Nucleic Acids Res. 28, 4051-4058.

25- Chafin, D.R., Vitolo, J.M., Henricksen, L.A., Bambara, R.A. and Hayes, J.J. (2000) Human DNA ligase I efficiently seals nicks in nucleosomes EMBO J. 19, 5492-5501.

26- Cloutier, T.E. and Widom, J. (2004) Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA Molec. Cell 14, 355-362.

27- Diffley, J.F.X. and Stillman, B. (1992) DNA binding properties of an HMG1-related protein from yeast mitochondria J. Biol. Chem. 267, 3368-3374.

28- Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E.H. and Bates, A.D. (1994) The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix J. Mol. Biol. 235, 825-847.

29- Lionberger, T.A., Demurtas, D., Witz, G., Dorier, J., Lillian, T., Meyhofer, E. and Stasiak, A. (2011) Cooperative kinking at distant sites in mechanically stressed DNA Nucleic Acids Res. 39, 9820-9832.

30- Du, Q., Smith, C., Shiffeldrim, N., Vologodskaia, M. and Vologodskii, A. (2005) Cyclization of short DNA fragments and bending fluctuations of the double helix Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 5397-5402.

31- Baltimore, D. (2011) NF-kB is 25 Nature Immunol. 12, 683-685

32- Gonçalves, C., Ardourel, M.Y., Decoville, M., Breuzard, G., Midoux, P., Hartmann, B. and Pichon, C. (2009) An optimized extended DNA kB site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression J. Gene Med. **11**, 401-411.

33- Koval, V.V., Kuznetsov, N.A., Ishchenko, A.A., Saparbaev, M.K. and Fedorova, O.S. (2010) Real-time studies of conformational dynamics of the repair enzyme E. coli

formamidopyrimidine-DNA glycosylase and its DNA complexes during catalytic cycle Mutation Res. 685, 3-10.

34- Bates, A.D. and Maxwell, A. (2005) DNA supercoiling in DNA Topology Oxford Univ. Press 2ND ED, pp 25-81.

35- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M. and Cozzarelli, N.R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in Escherichia coli J. Biol. Chem. 275, 8103-8113.

36- Pichon, C., Billiet, L. and Midoux, P. (2010) Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking *Cur. Opin. Biotech*. **21**, 1-6.

37- Hsu, C.Y. and Uludag, H. (2008) Effects of size and topology of DNA molecules on intracellular delivery with non-viral gene carriers BMC Biotech. **8**, 1-15.

FIGURE LEGENDS

Figure 1:

Scheme illustrating the present method of DNA circularization with overlapping blunt-ended nicked DNA substrates for minicircle production.

Figure 2:

Sequence of linear nicked blunt-ended duplexes formed by hybridization of appropriate complementary oligonucleotides and used in Abf2p dependent ligase-mediated circularization reaction for minicircles production as depicted in Figure 1. DNA substrates were designed to enhance the DNA flexibility by introducing a nick in the sugar-phosphate backbone. The sugar-phosphate backbone of both strands is nicked at the location indicated by the black arrow. The presence of a transcription factor consensus sequence is indicated in bold (NF-KB: GGGACTTTCC; ETS1: GGAAGCACTTCC; STAT3: TTCCCGTAA) and the human telomeric sequence is underlined. The presence of G/T mismatch is shown by size increased of the characters. The presence of a chemical base modification within oligonucleotide is indicated as follows: biotin dT (▲); cyanine 3 dT (♣); carboxyfluorescein dT (■); 8-oxoguanine (**x**).

Figure 3:

Image of stained native gel showing the strong decrease of oligomeric linear products formed in ligase-mediated circularization with the concomitant formation of minicircle product in the presence of Abf2p bending protein as compared to reaction carried out in the absence of Abf2p.

Figure 4:

Abf2p exhibits comparable binding activity for relaxed 95 bp DNA minicircle and corresponding linear overlapped DNA substrate containing two nicks as revealed by the

image of a stained gel from an EMSA experiment (A). For purpose comparison, both DNA substrates were loaded with or without Abf2p in a same well with linear DNA duplex D1 migrating faster than the corresponding circularized DNA. As shown in B, the percentage of protein complex formed with each DNA substrate was reported as a function of protein concentration.

Figure 5:

Scheme showing the production of single nicked double-stranded DNA minicircle that can be used in turn for the production of either single-stranded minicircle (pathway 1) or supercoiled double-stranded DNA minicircle (pathway 2).

Figure 6:

Image of stained denaturating gel showing that double-stranded minicircle is devoid of DNA strand nick.

Figure 7:

A stained native PAGE gel in the presence of 10 mM $MgCl_2$ for checking the presence of topoisomer DNA, indicates that a 95 bp minicircle is relaxed under standard conditions of circularization reaction.

Figure 8:

Image of stained denaturating PAGE gel of DNA minicircles with different sizes (84 to 200 bp in length).

Figure 9:

95 bp relaxed DNA minicircle designed to include one (A) or two (B) NF-κB binding sequences is capable to interact respectively with one or two NF-κB proteins as shown by EMSA.

Figure 10:

Image of denaturating stained gel showing that the presence of one or two site-specifically placed 8-oxoguanine residues within relaxed 95 bp DNA minicircle induces one or two Fpg-dependent strand breaks respectively, as deduced from the analysis of the nature and length of generated DNA products.

Figure 11:

95 bp relaxed DNA minicircle containing a site-specifically placed biotin residue binds to streptavidin as shown by EMSA.

Figure 12:

Stained native gel containing 10 mM $MgCl_2$ for the separation of 95 bp supercoiled DNA minicircles produced through ligation of a singly nicked minicircle intermediate in the presence of increasing concentration of the intercalating drug, ethidium bromide. Formation of 95 bp singly nicked minicircle intermediate is depicted in pathway 2 of Figure 5.

Figure 1

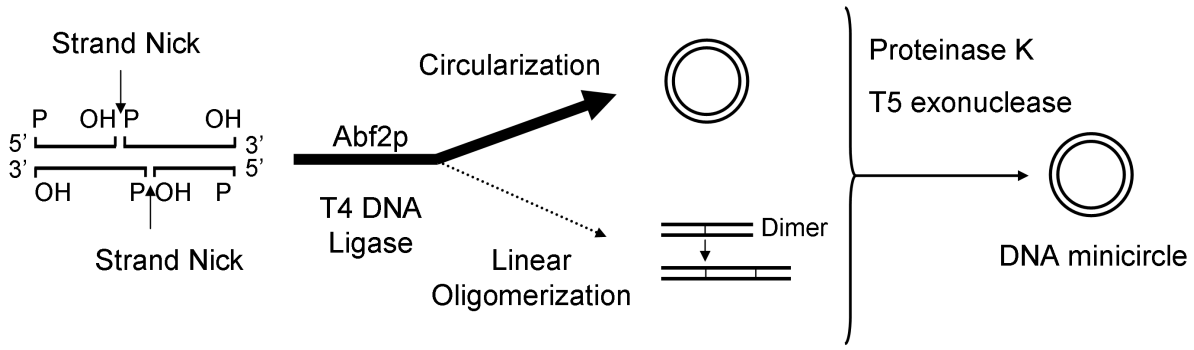

Strand Nick
P OH P OH
5' 3'
3' 5'
OH P OH P
Strand Nick
Abf2p
T4 DNA
Ligase
Circularization
Linear
Oligomerization
Dimer
Proteinase K
T5 exonuclease
DNA minicircle

Figure 2

```
P                                   OH P
|                                    | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATACTACGAGCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTATGATGCTCGTACC
                                                         | |                                      |
                                                         P OH                                     P
OH                                  OH P
|                                    | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATACTACGAGCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTATGATGCTCGTACC
                                                         | |                                      |
                                                         P OH                                     P
P                                   OH P
|                                    | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTACC
                                                         | |                          |
                                                         P OH                         P

P                                                       OH P                                      P
|                                                        | |                                     |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCT-ACAGATCAACTCCTTGCCATTGCCGTACGAGATC TAGCCTCTAGCTAGT-CGTGCTGATCATACTACGAGCATGG CGA-
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGA TGTCTAGTTGAGGAACGGTAACGGCATGCTCTAG-ATCGGAGATCGATCA GCACGACTAGTATGATGCTCGTACC-GCT-
                    | |                                                   | |
                    POH                                                   POH

-GTGAGCTTGACGCGATGG
-CACTCGAACTGCGCTACC
                  |
                  P

P                                   OH P                                                  OH P
|                                    | |                                                   | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATACTACGAGCATGG CGA-
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTATGATGCTCGTACC-GCT-
                                                         | |
                                                         POH

-GTGAGCTTGACG-CGATGACTTGGACCAAGACAGGAAGCACATGTTCCTGGAGATTACTGG
-CACTCGAACTGC GCTACTGAACCTGGTTCTGTCCTTCGTGTACAAGGACCTCTAATGACC
            | |                                            |
            POH                                            P

P                                   OH P                                                  OH P
|                                    | |                                                   | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATACTACGAGCATGG CGA-
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTATGATGCTCGTACC-GCT-
                                                         | |
                                                         POH
                                                             OH P
                                                             | |
-GTGAGCTTGACG-CGATGACTTGGACCAAGACAGGAAGCACATGTTCCTGGAGATTACTGG CCTAGCACGTGACGG-CTGCAGGTATCTAAGAGAGCGA-
-CACTCGAACTGC GCTACTGAACCTGGTTCTGTCCTTCGTGTACAAGGACCTCTAATGACC-GGATCGTGCACTGCC GACGTCCATAGATTCTCTCGCT-
            | |                                                               | |
            POH                                                               POH

-GTGG
-CACC
    |
    P

P                                   OH P
|                                    | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATC**GGGACTTTCC**CA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATACTACGAGCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAG**CCCTGAAAGG**GT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTATGATGCTCGTACC
                                                         | |                                      |
                                                         P OH                                     P

P                                   OH P
|                                    | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATC**GGGACTTTCC**CA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAG**GGGACTTTCC**CTGATCATACTACGAGCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAG**CCCTGAAAGG**GT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATC**CCCTGAAAGG**GACTAGTATGATGCTCGTACC
                                                         | |                                      |
                                                         P OH                                     P
```

D1

D2

D3

D4

D5

D6

D7

D8

```
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGCGCTAGCCTGGGGACTTTCCA GCTGGGGACTTTCCA-GCTGGGGACTTTCCAGGAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCGCGATCGGACCCCTGAAAGGT-CGACCCCTGAAAGGT CGACCCCTGAAAGGTCCTCTAAGTCCTAGTCCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTATGGGGACTTTCCATGGGGACTTTCCATGGGGACTT TCCATAGCTTGCTGG-GGACTTTCCATGGGGACTTTCCATGGGGACTTTCCATTGG
GGAATACCCCTGAAAGGTACCCCTGAAAGGTACCCCTGAA-AGGTATCGAACGACC CCTGAAAGGTACCCCTGAAAGGTACCCCTGAAAGGTAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGGGACTTTCCGTACTCGTTGCT ACGTGCATTTCCCGT-AAATCTCCATGGATCCAGGAAGCACTTCCTGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCCCTGAAAGGCATGAGCAACGA-TGCACGTAAAGGGCA TTTAGAGGTACCTAGGTCCTTCGTGAAGGACCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG GGTTAGGGTTAGGGT-TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTTGG
GGAACCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATC-CCAATCCCAATCCCA ATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH
|                                    |
CCAAGGTCTCAAGACTGATCTATAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTTGTGCTGATCATACTACGAGCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTATGATGCTCGTACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
```

ODN with chemical modifications :

```
P                                   OH P
|                                    | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATACTACGAGCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAGATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATGCTCTAG ATCGGAGATCGATCAxCACGACTAGTATGATGCTCGTACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCAAGGCCTCAAGACTGATCTACAGATCAACTCCTTGCCA TTGCCGTACGAGATC-TAGCCTCTAGCTAGTCGTGCTGATCATACTACGAGCATGG
GGTTCCGGAGTTCTGACTAxATGTCTAGTTGAGGAACGGT-AACGGCATxCTCTAG ATCGGAGATCGATCAGCACGACTAGTATGATGCTCGTACC
                                                         | |                                     |
P                                   OH P                 P OH                                    P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGCGCTAGCCTGGGGACTTTCCA GCTGGGGACTTTCCA-GCTGGGGACTTTCCAGGAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCGCGATCGGACCCCTGAAAGGT-CGACCCCTGAAAGGT CGACCCCTGAAAGGTCCTCTAAGTCCTAG▲CCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGCGC▲AGCCTGGGGACTTTCCA GCTGGGGACTTTCCA-GCTGGGGACTTTCCAGGAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCGCGATCGGACCCCTGAAAGGT-CGACCCCTGAAAGGT CGACCCCTGAAAGGTCCTCTAAGTCCTAG▲CCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGCGCTAGCCTGGGGACTTTCCA GCTGGGGACTTTCCA-GCTGGGGACTTTCCAGGAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCGCGATCGGACCCCTGAAAGGT-CGACCCCTGAAAGGT CGACCCCTGAAAGGTCCTCTAAGTCCTAG♣CCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGCGC♣AGCCTGGGGACTTTCCA GCTGGGGACTTTCCA-GCTGGGGACTTTCCAGGAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCGCGATCGGACCCCTGAAAGGT-CGACCCCTGAAAGGT CGACCCCTGAAAGGTCCTCTAAGTCCTAG♣CCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGCGCTAGCCTGGGGACTTTCCA GCTGGGGACTTTCCA-GCTGGGGACTTTCCAGGAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCGCGATCGGACCCCTGAAAGGT-CGACCCCTGAAAGGT CGACCCCTGAAAGGTCCTCTAAGTCCTAG■CCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
P                                   OH P
|                                    | |
CCTTCGGATTATCGGACGGCGC■AGCCTGGGGACTTTCCA GCTGGGGACTTTCCA-GCTGGGGACTTTCCAGGAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG
GGAAGCCTAATAGCCTGCCGCGATCGGACCCCTGAAAGGT-CGACCCCTGAAAGGT CGACCCCTGAAAGGTCCTCTAAGTCCTAG■CCACTGAACC
                                                         | |                                     |
                                                         P OH                                    P
```

D9

D10

D11

D12

D13

D14

D15

D16

D17

D18

D19

D20

D21

Figure 3

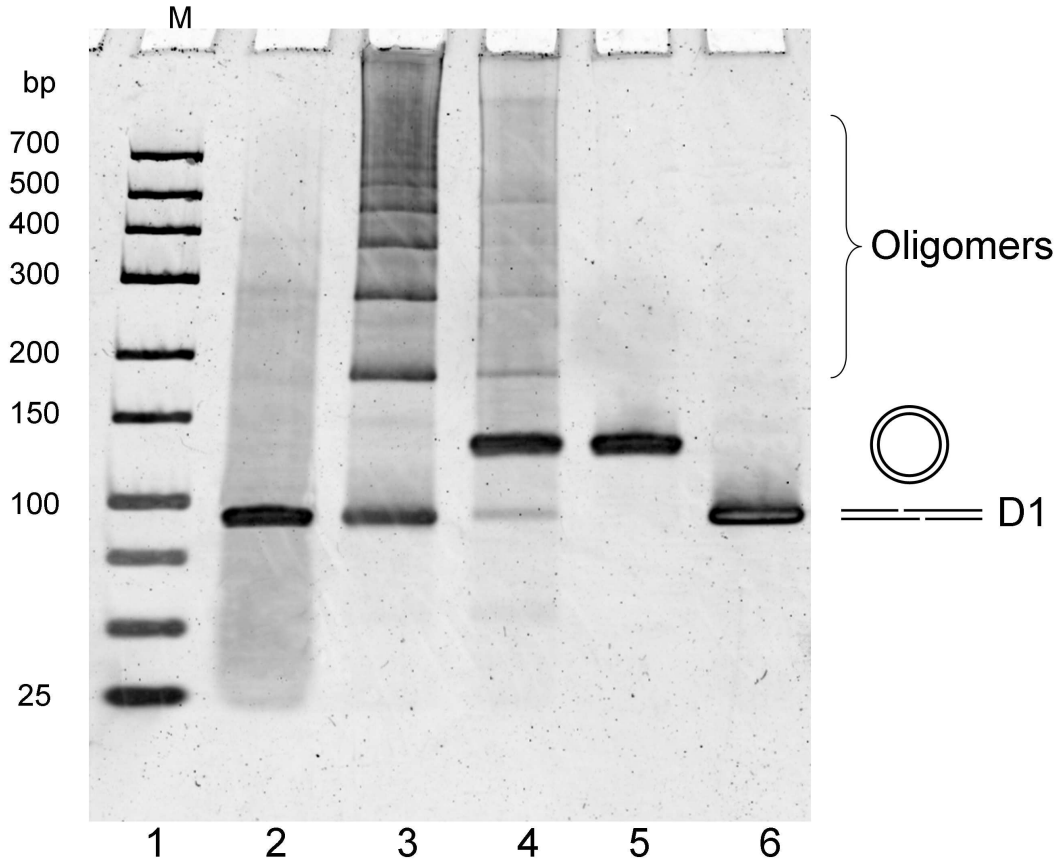


Figure 4

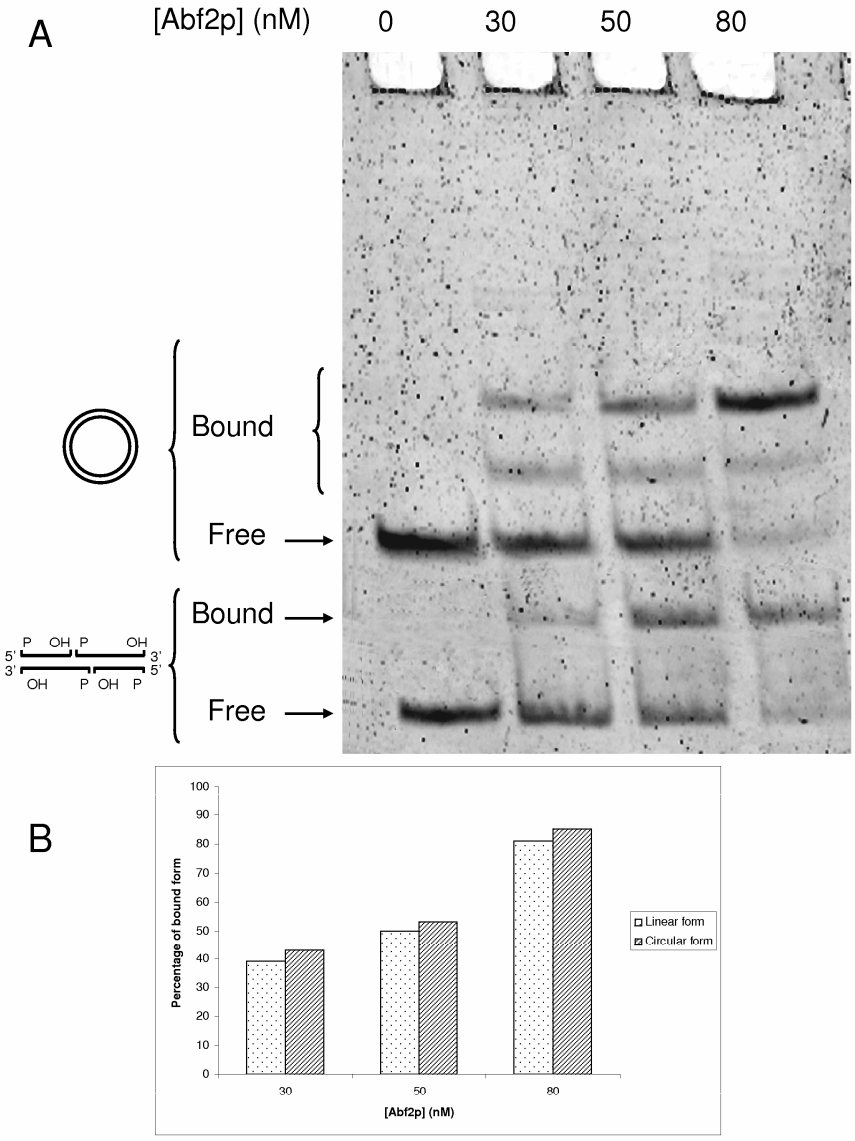

A
[Abf2p] (nM)
0
30
50
80
Bound
Free
Bound
Free
P OH P OH
5' 3'
3' 5'
OH P OH P
B
Percentage of bound form
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
30
50
80
[Abf2p] (nM)
Linear form
Circular form

Figure 5

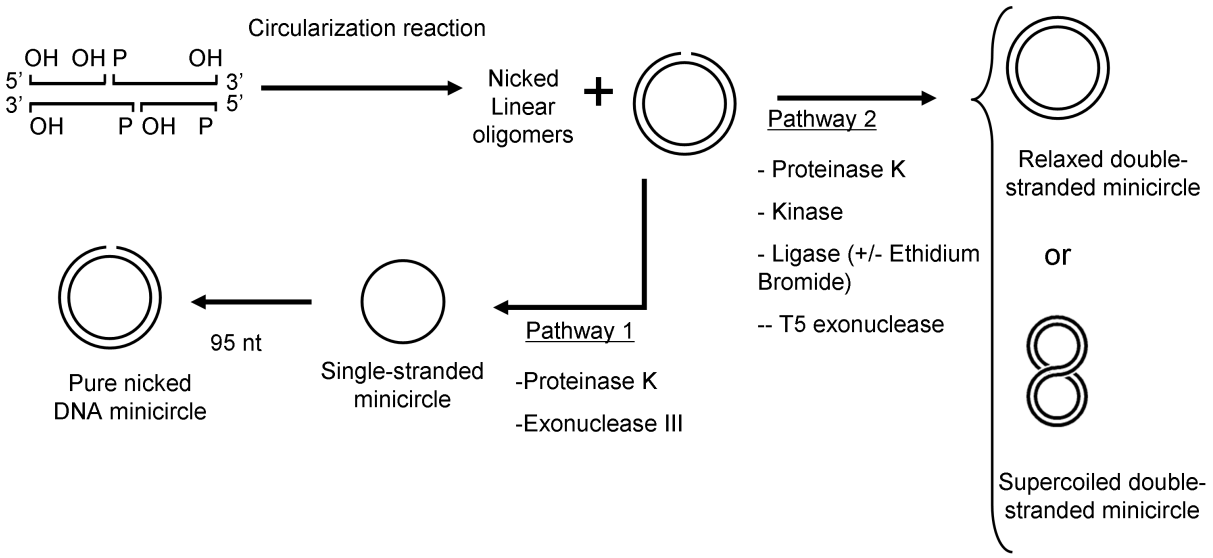

Circularization reaction
OH OH P OH
5' 3'
3' 5'
OH P OH P
Nicked
Linear
oligomers
Pathway 2
- Proteinase K
- Kinase
- Ligase (+/- Ethidium Bromide)
-- T5 exonuclease
Relaxed double-stranded minicircle
or
Supercoiled double-stranded minicircle
Pathway 1
-Proteinase K
-Exonuclease III
Single-stranded minicircle
95 nt
Pure nicked DNA minicircle

Figure 6

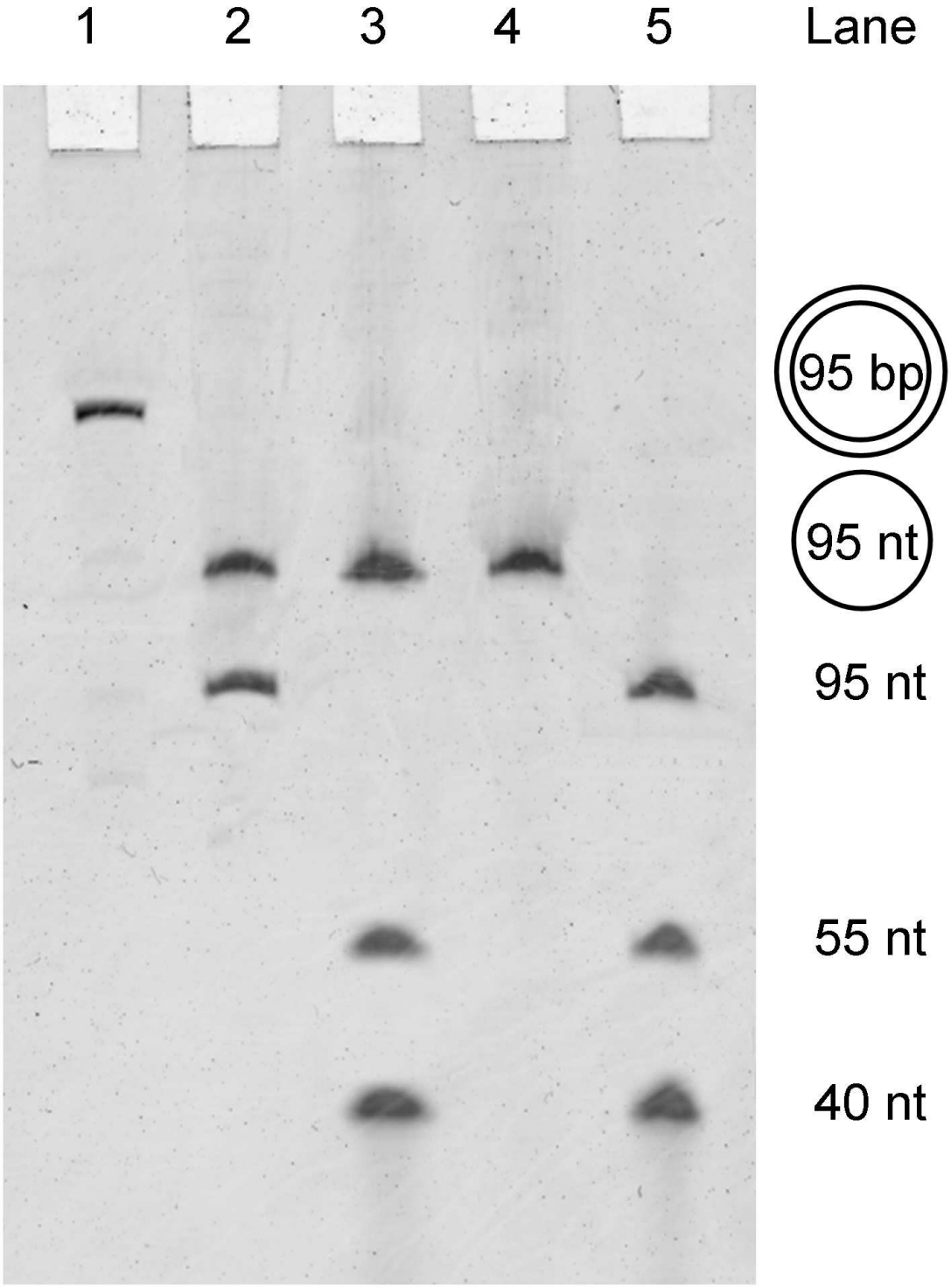


Figure 7

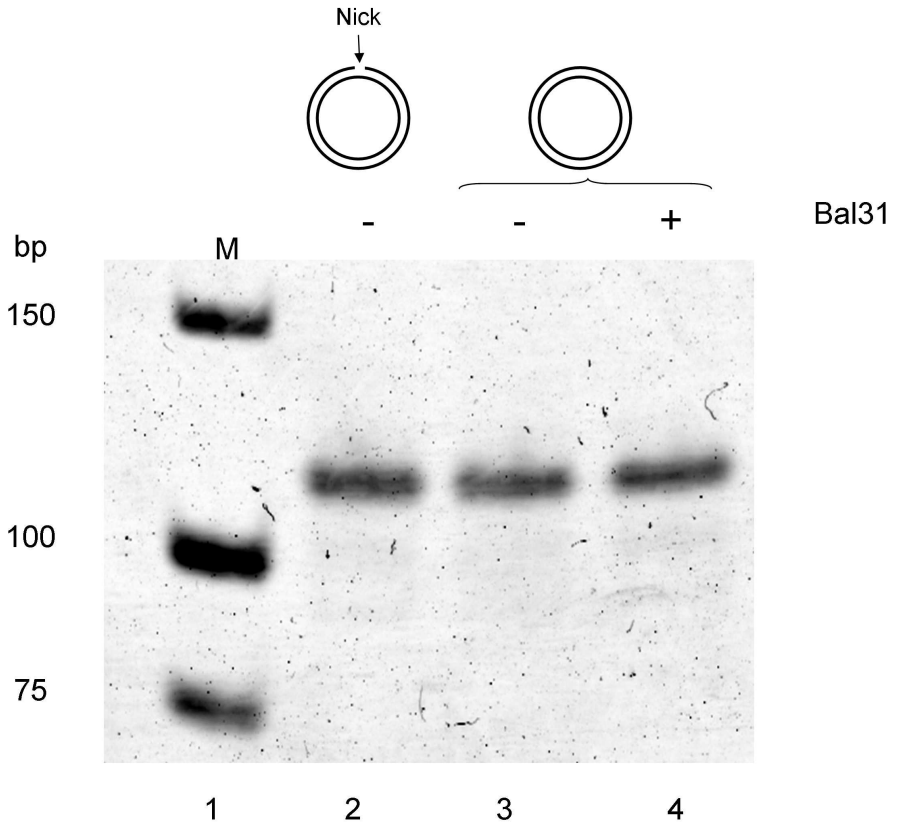


Figure 8

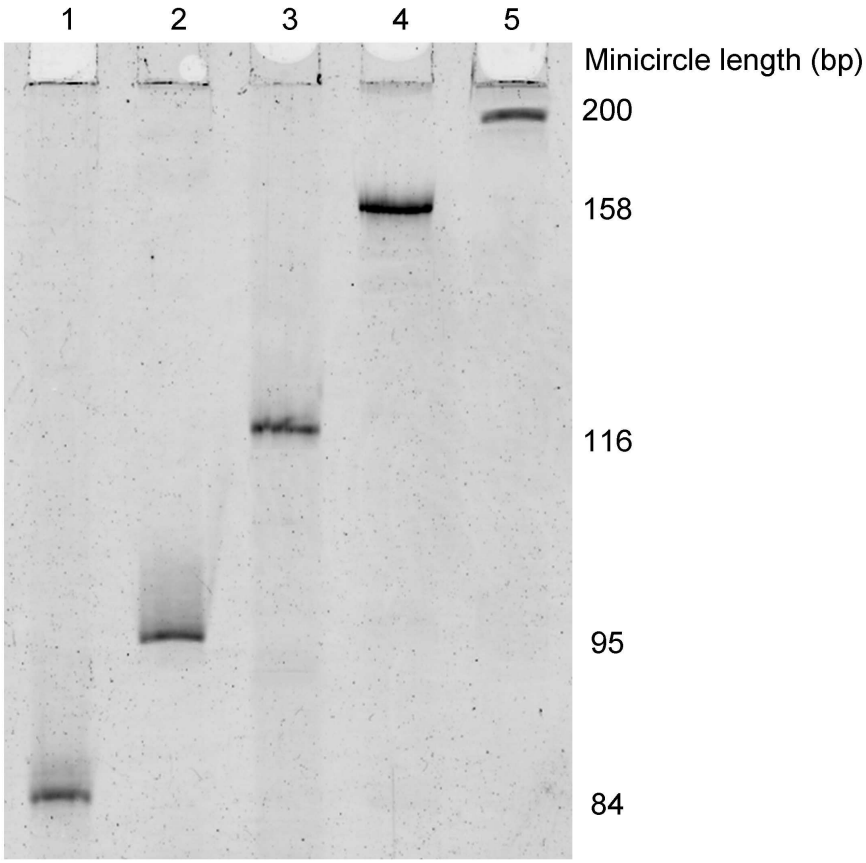


Figure 9

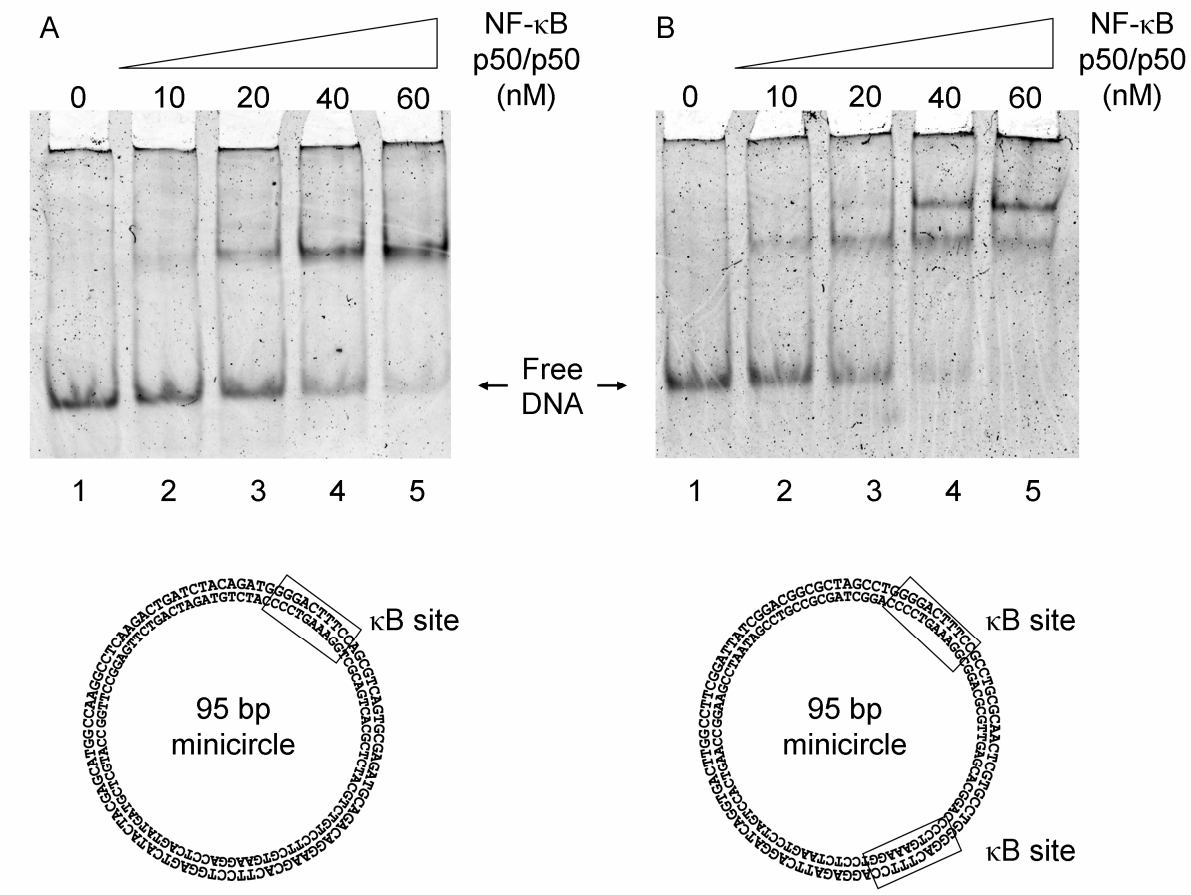

A
NF-κB
p50/p50
(nM)
0
10
20
40
60
1
2
3
4
5
Free
DNA
B
NF-κB
p50/p50
(nM)
0
10
20
40
60
1
2
3
4
5
κB site
95 bp
minicircle
κB site
95 bp
minicircle
κB site

Figure 10

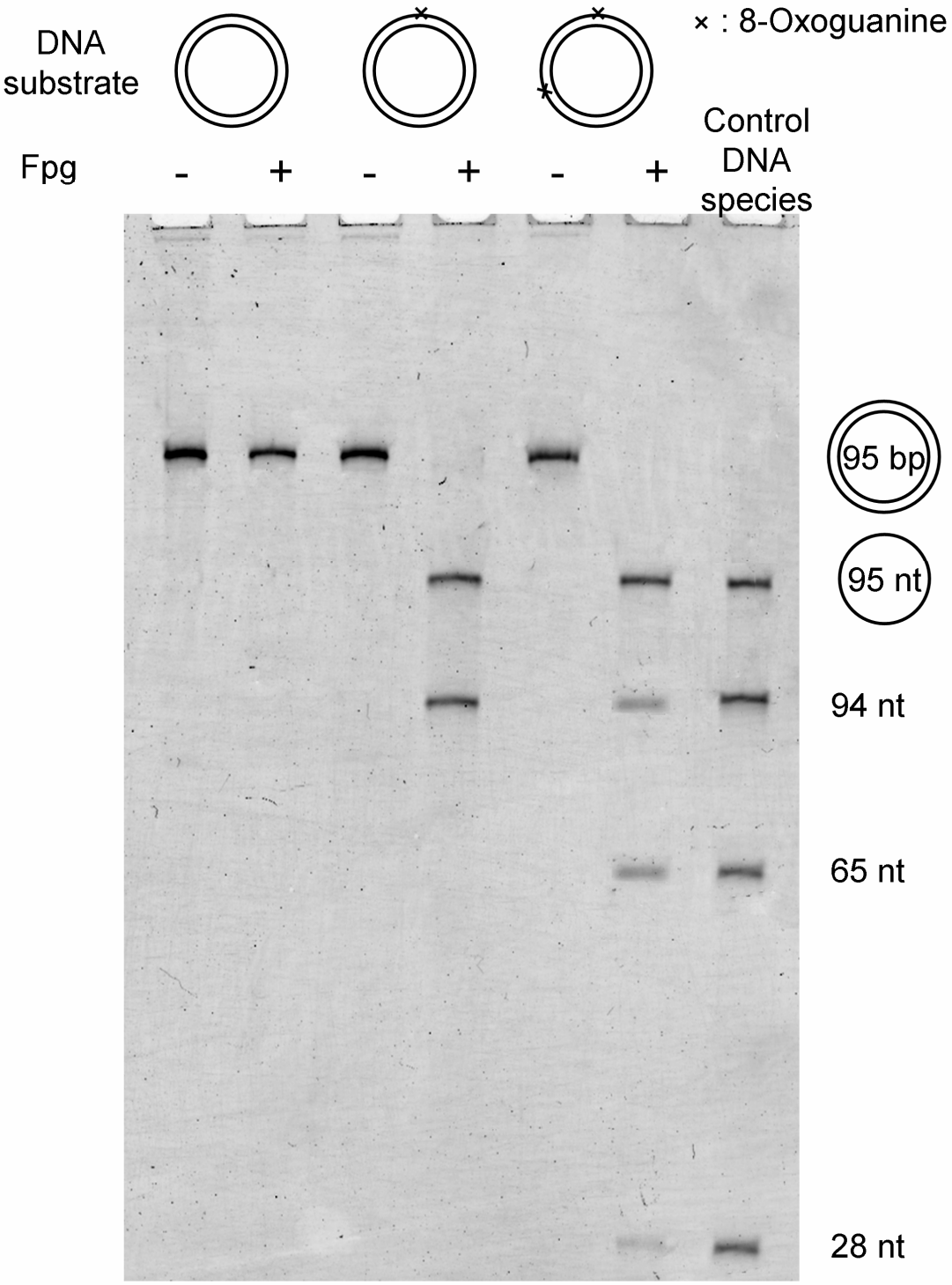

DNA substrate
× : 8-Oxoguanine
Fpg
- + - + - +
Control DNA species
95 bp
95 nt
94 nt
65 nt
28 nt

Figure 11

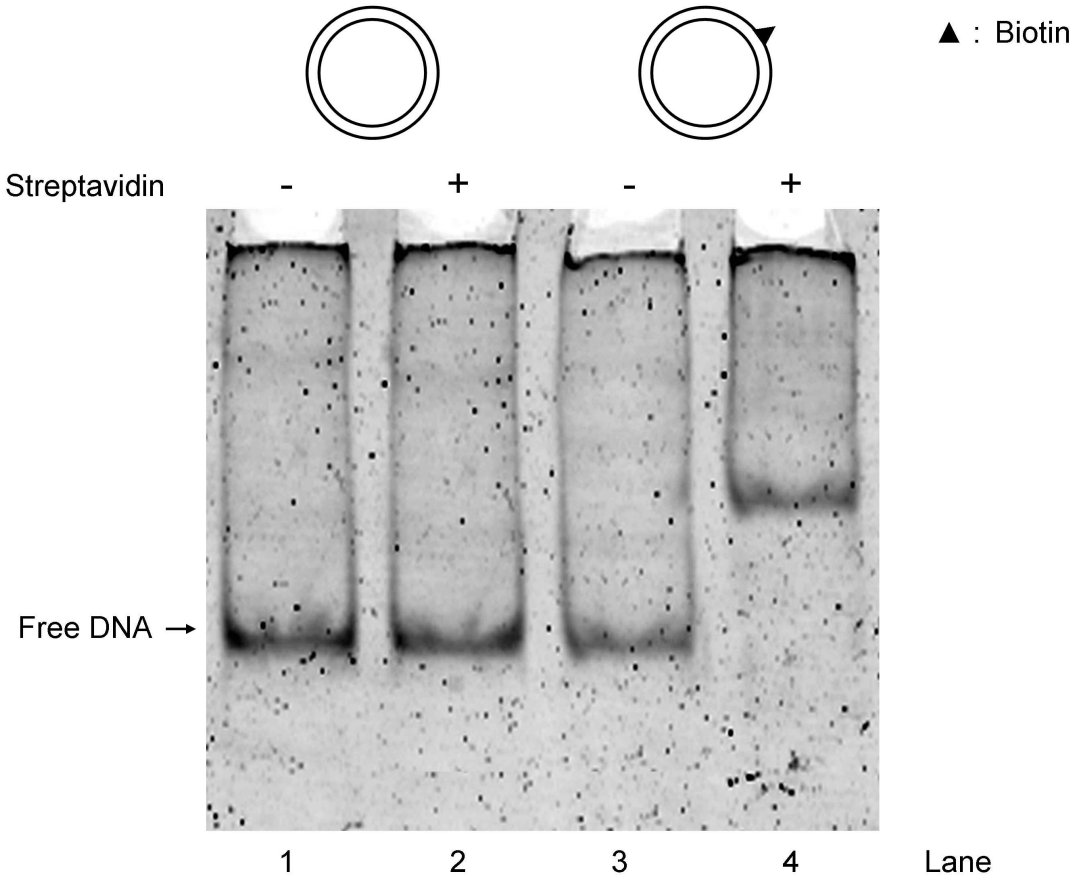
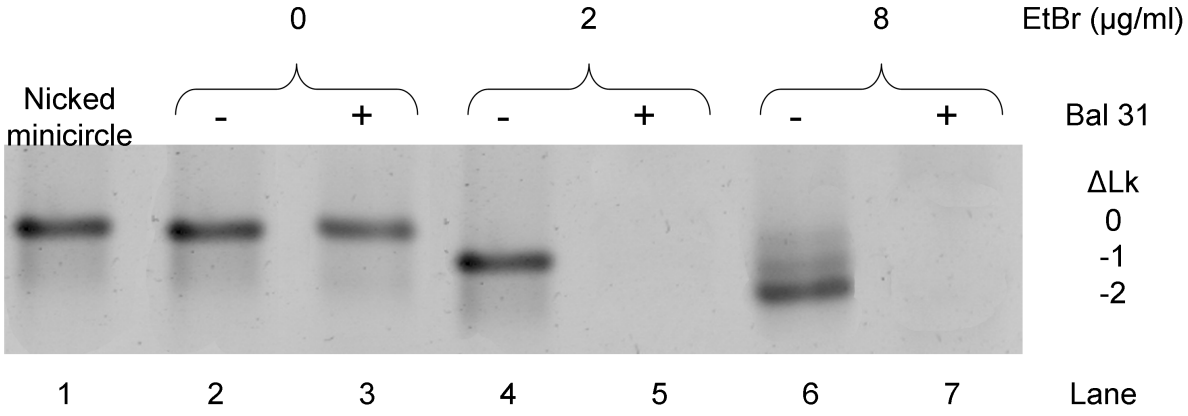


Figure 12



Résultats en cours

1ère partie

Biostabilité, délivrance intracellulaire d'un minicercle et effet sur la transcription NF-κB dépendante

Biostabilité, délivrance intracellulaire d'un minicercle et effet sur la transcription NF-κB dépendante.

Au sein des voies de signalisation cellulaire, les facteurs de transcription se lient à des motifs d'ADN spécifiques dans une région promotrice d'un gène de sorte à activer le gène situé en aval[115]. La dérégulation d'un facteur de transcription peut être à l'origine de pathologies comme par exemple le cancer de la prostate où le facteur de transcription NF-κB est dérégulé[244] ou d'autres cancers où le facteur de transcription Stat3 provoque une surexpression de gènes comme Bcl-xL, la cycline D1, c-Myc ou le VEGF[245–248].

La stratégie du leurre moléculaire consiste à piéger des facteurs de transcription surexprimés dans la cellule. Les leurres moléculaires sont de petits duplexes d'oligodésoxyribonucléotides (ODN) contenant une séquence de liaison et qui se lient au facteur de transcription de manière spécifique[115]**.** Ces petits duplexes sont utilisés comme leurre moléculaires *in vivo* pour piéger un facteur de transcription cible[249].

Les nombreux résultats récents d'une part sur l'utilisation des ODN en thérapie génique et d'autre part sur les mécanismes moléculaires de plus en plus fins à l'origine de maladies humaines servent de base au concept puis au développement de nouvelles stratégies à visée thérapeutique. De nombreux résultats de biologie montrent l'interdépendance des voies de signalisation cellulaire comme celles régulant la survie et la mort cellulaire. Le concept de multiciblage par une seule molécule thérapeutique a été récemment proposé pour améliorer la stratégie la plus couramment utilisée, c'est-à-dire un ciblage unique[250]. Une difficulté est de trouver une stratégie thérapeutique pour obtenir un multiciblage. Les « miRNA sponge », qui sont en cours de développement, ont potentiellement la capacité d'inhiber plusieurs miRNA comme antagomir. Cependant, la longueur de ces molécules et l'augmentation des effets non spécifiques pourraient limiter le développement de cette stratégie. Il est donc très important de mettre au point d'autres stratégies de multiciblage thérapeutique.

Dans ce travail, nous avons développé une nouvelle molécule d'ADN circulaire. Lutilisation de ce type de molécule notamment comme leurre moléculaire nous semble important à développer.

Dans ce travail, nous avons d'abord étudié si un minicercle présentait une biostabilité dans le sérum malgré le fait d'être en série phosphodiester. Puis, pour déterminer un effet sur la transcription NF-κB dépendante, des minicercles ciblant spécifiquement NF-κB ont été délivrés dans des cellules rénales embryonnaires humaines (Hek 293) qui expriment de façon stable la protéine firefly-luciférase (luc2P) dont la transcription du gène est sous la dépendance de NF-κB.

Matériel et méthodes

Matériel. Les minicercles utilisés sont synthétisés selon la méthode décrite dans le chapitre résultats, 1ère partie. La séquence du cercle non spécifique est établie de sorte à obtenir un score d'interaction le plus faible possible entre le minicercle et l'ensemble des facteurs de transcription recensés par les bases de données Jaspar (jaspar.genereg.net) et TESS (cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess). La séquence du cercle ciblant NF-κB possède 2 sites de liaison à NF-κB distants de 20 pb, de telle sorte qu'il y ait 2 pas d'hélice d'ADN entre les 2 sites et que chaque protéine se fixe de façon identique au minicercle. Selon les indications décrites dans le texte, les cercles sont soit relâchés ($\Delta Lk = 0$), soit surenroulés ($\Delta Lk = -1$). Le duplexe de 22 pb correspond à 2 oligonucléotides de 22 nucléotides qui sont appariés. La séquence des minicercles et du duplexe linéaire de 22 pb sont indiquées sur la figure 1. Le plasmide pTAL-luc a été obtenu auprès de Clontech (USA).

La lignée cellulaire rénale embryonnaire humaine (Hek293) fournie par Promega (Madison, U.S.A.) exprime de façon stable la firefly luciferase (luc2P) sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur TATA contenant des éléments de réponse à NF-κB (NF-κB-REs). Ainsi, la transcription du gène de la luciférase est sous la dépendance du facteur de transcription NF-κB.

La protéine NF-κB $(p50)_2$ est obtenue chez Promega. Sa taille est de 453 acides aminés soit 20 acides aminés supplémentaires par rapport à la protéine NF-κB p50 humaine.

Le sérum humain et le polyacrylamide ont été obtenus chez Sigma-Aldrich, le phénol chloroforme a été fourni par Invitrogen et le Gelred par Biotium.

Le DMEM, le PBS, le sérum de veau fœtal (SVF), la solution de pénicilline, streptomycine (10000 Unités/mL de Pénicilline, 10 mg/mL de streptomycine), la trypsine ont obtenus chez PAA. L'OptiMEM a été acheté chez Gibco. Le TNF-α (Tumor Necrosis Facteur α) est fourni par Milteny Biotech. L'alamar Blue a été acheté chez Invitrogen et la luciférine chez Promega.

Le SiPort est obtenu auprès de Ambion, la Lipofectamine 2000 auprès de Invitrogen et le PTG1 auprès de Polythéragène.

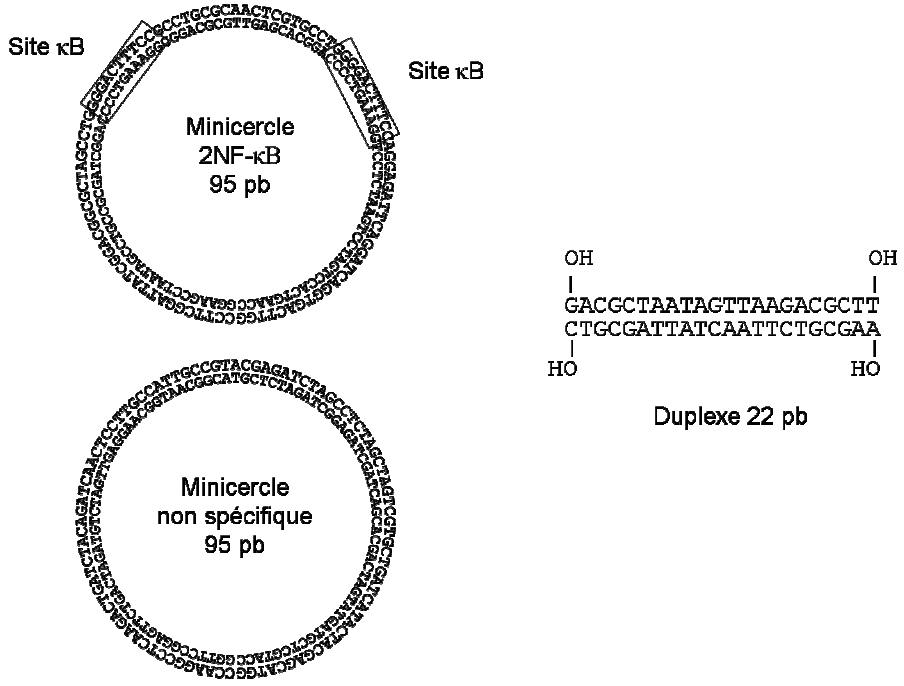


Figure 1
Séquence des différents ADN utilisés. Le minicercle utilisé pour tester une activité d'inhibition de la transcription NFkB dépendante possède 2 sites consensus de reconnaissance de NF-κB. Le minicercle non spécifique ne possède pas de site de reconnaissance de NF-κB.

Stabilité des cercles dans le sérum humain. 365 ng d'ADN à une concentration de 24 µg/mL dans un tampon 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5 sont incubés à 37°C dans un volume équivalent de sérum humain 100 % durant le temps indiqué. 2 extractions par la technique du Phénol-Sevag sont ensuite réalisées successivement pour enlever les protéines sériques. 65 ng d'ADN sont ensuite prélevés, mis en présence de formamide puis analysés sur un gel. La migration du plasmide est effectuée sur un gel 0,8 % agarose natif pendant 30 min

à 100 V. Le duplexe linéaire est déposé sur un gel dénaturant 20% acrylamide, 8M urée (19:1 acrylamide/bisacrylamide (w/w); 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA, 8M urée, pH 8.3) et migre pendant 90 min à 21 W. Les minicercles sont déposés sur un gel dénaturant 8% Acrylamide, 8M Urée. (19:1 acrylamide/bisacrylamide (w/w); 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA, 8M Urée, pH 8.3) et l'électrophorèse est menée pendant 40 min à 21 W. La coloration de l'ADN est réalisée en incubant le gel pendant 20 min dans du GelRed. Les gels sont ensuite déposés sur un lecteur Gene Flash Image Station (Syngene Cambridge, UK) pour visualisation des bandes. La stabilité de chaque ADN est déterminée en quantifiant l'intensité du produit de départ à chaque temps d'incubation. Pour cela, le logiciel ImageQuant 5.1 est utilisé.

Interaction *in vitro* entre les minicercles et NF-κB. La protéine est incubée en fonction de la concentration comme indiqué avec un minicercle (10 ng) dans un tampon pH 7,5 contenant 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 3 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 2% glycérol, 50 µg/mL BSA acétylée, pendant 30 min à 4°C. La réaction est déposée sur un gel 5% polyacrylamide (19:1 acrylamide/bisacrylamide (w/w), 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA, pH 8.3) et l'électrophorèse menée pendant 1h. La coloration est réalisée en incubant le gel dans du SYBR Green pendant 20 min. Les gels sont ensuite déposés sur un phosphoroimageur Typhoon pour une analyse de fluorescence. La fraction liée (intensité du complexe lié/intensité totale) est déterminée en utilisant le logiciel ImageQuant 5.1.

Cellules et culture cellulaire. Les cellules Hek293 exprimant la luciférase sous la dépendance de la transcription NF-kB dépendante sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 95% air et 5% CO_2 et sont repiquées tous les 3-4 jours. Pour cette étape, 5.10^5 cellules sont repiquées dans des boîtes plastique de 25 cm^2 dans un milieu DMEM avec glutamine enrichi avec 1% d'une solution Pénicilline-Streptomycine et 10% de SVF décomplémenté par la chaleur.

Formation des complexes minicercles d'ADN 95 pb avec la Lipofectamine 2000. 333 ng d'ADN sont déposés dans qsp 10 µL OptiMEM et un volume adéquat de Lipofectamine 2000 est déposé dans qsp 10 µL OptiMEM. Un ratio 1 de Lipofectamine 2000 correspond à 1 µL de Lipofectamine 2000 pour 1 µg d'ADN. La Lipofectamine 2000 est ensuite déposée sur l'ADN, le mélange des 2 composés est effectué par aspiration

refoulement puis la complexation est réalisée durant 20 min à température ambiante sans agitation.

Formation des complexes minicercles d'ADN 95 pb avec le SiPort. 333 ng d'ADN sont déposés dans qsp 10 µL OptiMEM et un volume adéquat de SiPort est déposé dans qsp 10 µL OptiMEM. Un ratio 1 de SiPort correspond à 1 µL de SiPort pour 200 ng d'ADN. Le SiPort est ensuite déposé sur l'ADN, les 2 composés sont mélangés par aspiration refoulement puis la complexation est réalisée durant 20 min à température ambiante sans agitation.

Formation des complexes minicercles d'ADN 95 pb avec le PTG1. 333 ng d'ADN sont déposés dans qsp 6,5 µL de tampon Hepès 10 mM pH 7,4 et un volume adéquat de PTG1 est déposé dans le même volume de tampon Hepès 10 mM, pH 7,4. Un ratio 1 de PTG1 correspond à 1 µL de PTG1 pour 1 µg de DNA. Le PTG1 est ensuite déposé sur l'ADN, les 2 composés sont vortexés pendant 4 sec puis la complexation est réalisée durant 20 min à température ambiante sans agitation.

Transfection des cellules HEK293-NFluc. 15000 cellules HEK293-NFluc sont déposées dans un puits d'une plaque de 96 puits dans un milieu DMEM avec 10 % sérum sans antibiotiques. Après une nuit, les complexes sont formés comme décrit ci-dessus puis dilués avec de l'OptiMEM non supplémenté (dans les cas du SiPort et du PTG1) ou supplémenté de 3 % sérum (dans le cas de la Lipofectamine 2000) afin d'obtenir un volume final de 100 µL et une concentration finale d'ADN de 50 nM. Les complexes sont alors déposés sur les cellules. Les cellules sont incubées pendant 4h à 37°C puis 100 µL de DMEM supplémenté avec 20 % sérum et avec du TNF-α à une concentration finale de 25 ng/mL sont ajoutés. Toutes les expériences sont réalisées en triple.

Internalisation des complexes dans les cellules. Les cellules sont transfectées avec des complexes formés comme décrit précédemment mais avec un minicercle marqué avec de la fluorescéine. 24 heures après transfection, les cellules sont successivement décollées avec de la trypsine, centrifugées, et reprises dans du PBS. La quantification du nombre de cellules transfectées est réalisée en analysant l'intensité de fluorescence de la fluorescéine dans chaque cellule à l'aide du cytomètre en flux FACSort (Becton-Dickinson, Grenoble, France).

Localisation des minicercles dans la cellule. Les cellules sont déposées sur des lames Lab-tek et sont transfectées avec des complexes formés comme décrit précédemment mais avec un minicercle marqué avec de la fluorescéine. 4 heures après transfection, les cellules sont observées directement sans fixation à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Iena, Allemagne).

Mesure de la survie cellulaire. 24 heures après transfection, 10 µL d'Alamar Blue (Invitrogen) sont ajoutés dans chaque puits de 0,33 cm² d'une plaque de 96 puits et les cellules sont incubées pendant 1h30 à 37°C. La fluorescence à 605 nm est ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur multiplaques Victor 3V (Perkin Elmer). L'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de cellules viables dans le puits.

Dosage de la luciférase. 24 heures après transfection, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées avec 50 µL d'un tampon de lyse (25 mM Tris-Phosphate, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 15 % Glycérol, 8 mM $MgCl_2$, 1 % Triton, pH 7,8) pendant 15 minutes. 15 µL de lysat sont prélevés, 100 µL de tampon de lyse sans triton et supplémenté avec 1 mM ATP sont ajoutés au lysat puis 150 µL d'une solution 1mM luciférine sont également ajoutés. L'activité de la luciférase est mesurée par luminescence à l'aide du luminomètre Lumat LB 9507 (Berthold).[251]

Modélisation informatique. Les minicercles sont modélisés à l'aide du serveur 3D-DART[252]. Un ADN linéaire de 95 pb est créé puis les extrémités sont raccordées. Le twist de l'ADN ainsi que l'angle de courbure ont été optimisés pour que la superposition des extrêmités soit bonne. Ensuite le cercle est relaxé par minimisation et dynamique moléculaire à l'aide du logiciel Amber version 11[253]. Le complexe cristallographique ADN/protéine NF-κB $(p50)_2$ a été extrait de la Protein Data Bank (code 1NFK) et positionnée sur le cercle par alignement des C4' entre la séquence kB ADN du complexe et celle correspondante dans le minicercle à l'aide du logiciel Chimera (Université de Californie, San Francisco)[254].

A/ Stabilité d'un minicercle dans le sérum humain

Afin d'étudier la biostabilité des minicercles dans du sérum humain, de l'ADN sous forme plasmidique, linéaire ou minicercle est incubé dans du sérum humain durant le temps indiqué. La dégradation du produit de départ est ensuite analysée par électrophorèse (Figure 2 A, B, C) et une quantification de la bande correspondant au produit de départ est effectuée pour chaque temps d'incubation, ceci permettant de déterminer la stabilité de l'ADN en fonction du temps (Figure 2D).

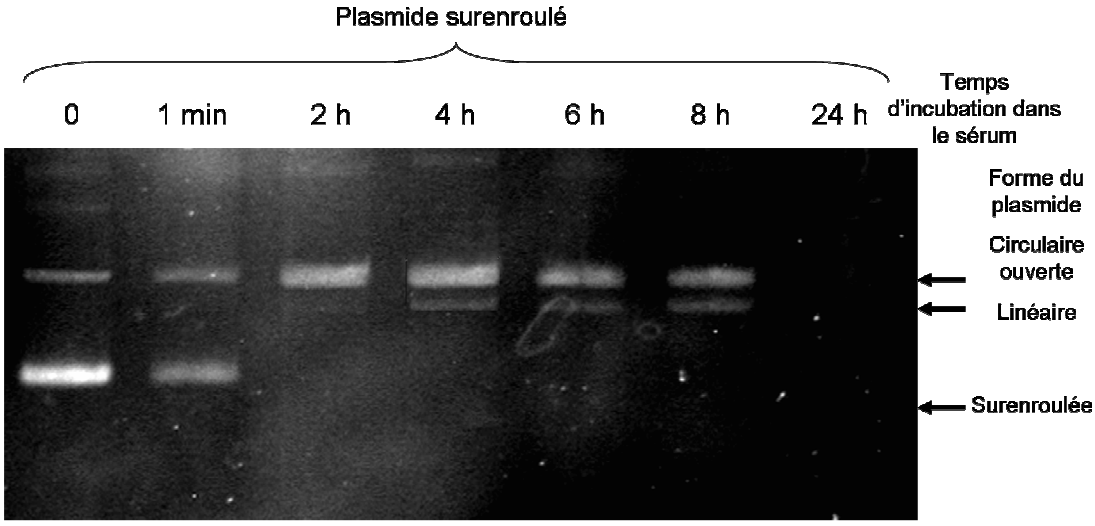
En ce qui concerne le plasmide, une coupure traduit la diminution de la forme surenroulée au profit de l'apparition d'une forme circulaire ouverte (Figure 2A). le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) est de l'ordre d'une minute, ceci est en accord avec les observations de Houk et coll[255].

En ce qui concerne le duplexe de 22 pb, une coupure se traduit par la diminution de l'intensité du produit de départ et par l'apparition d'un oligonucléotide de 21 pb (Figure 2B). Le temps de vie ($t_{1/2}$) du duplexe de 22 pb est de l'ordre de 5h. Ceci est en accord avec les observations d'Osako et coll[85].

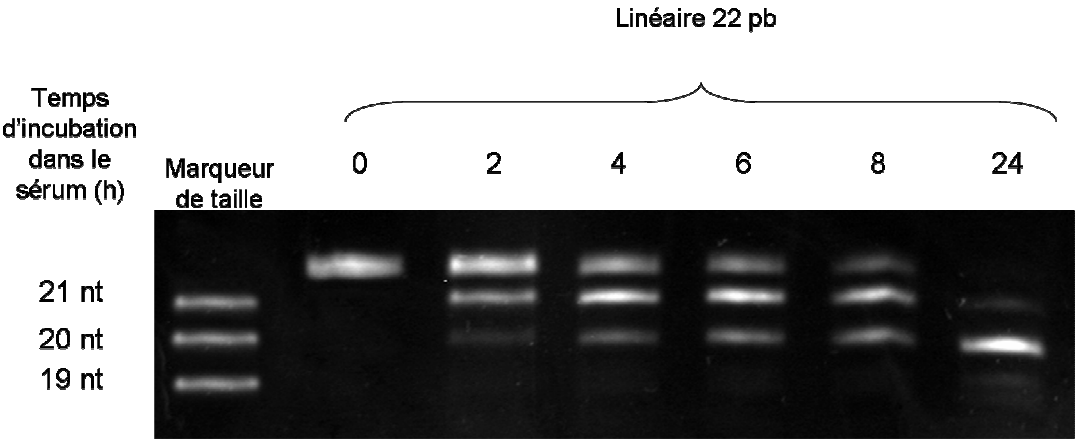
Nos conditions expérimentales peuvent donc être utilisées pour déterminer la biostabilité des minicercles dans le sérum puisque ces conditions ont permis de retrouver les valeurs de biostabilité précédemment décrites de molécules d'ADN.

En ce qui concerne le minicercle double brin, une coupure se traduit par la diminution de l'intensité du produit de départ et par l'apparition de 2 produits visibles sur le gel dénaturant, un cercle simple brin et un oligonucléotide linéaire (Figure 2C). En ce qui concerne les cercles relâchés et surenroulés, le $t_{1/2}$ est de l'ordre de 11h. On peut donc conclure qu'un cercle est plus résistant à une dégradation dans le sérum humain qu'un duplexe linéaire. On peut également conclure que la conformation relâchée ou surenroulée du cercle n'a pas d'incidence sur le $t_{1/2}$.

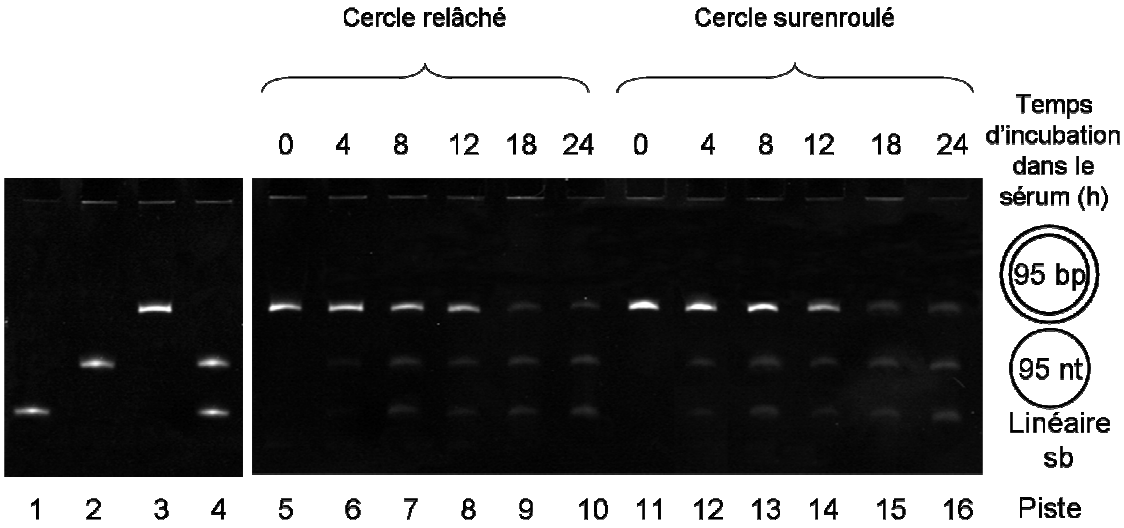
A


Plasmide surenroulé
0
1 min
2 h
4 h
6 h
8 h
24 h
Temps d'incubation dans le sérum
Forme du plasmide
Circulaire ouverte
Linéaire
Surenroulée

B


Linéaire 22 pb
Temps d'incubation dans le sérum (h)
Marqueur de taille
0
2
4
6
8
24
21 nt
20 nt
19 nt

C


Cercle relâché
Cercle surenroulé
0 4 8 12 18 24 0 4 8 12 18 24
Temps d'incubation dans le sérum (h)
95 bp
95 nt
Linéaire sb
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Piste

D

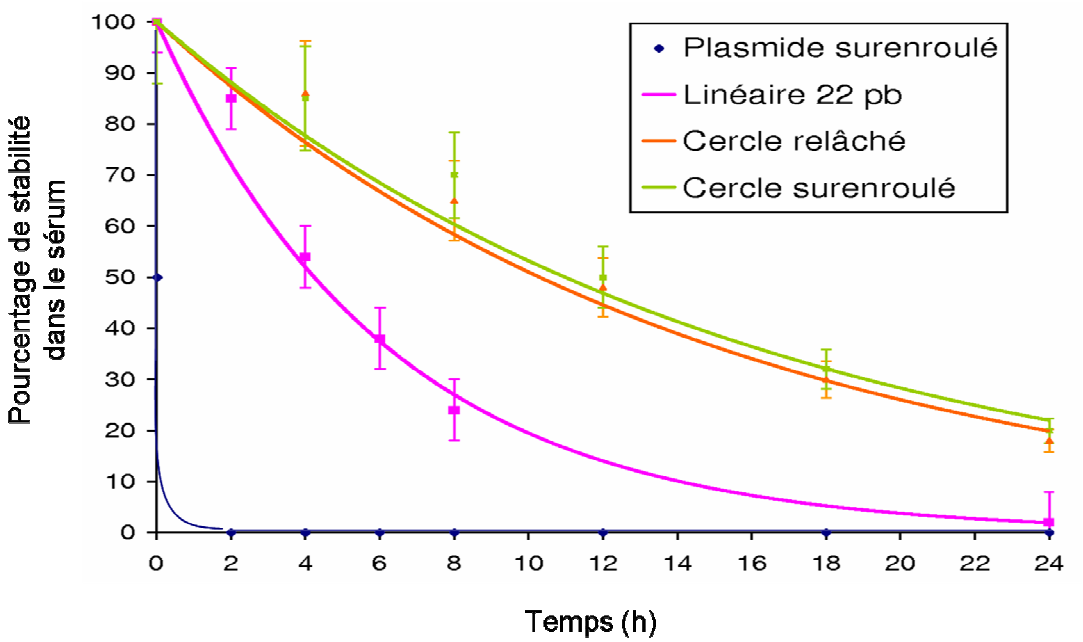


Figure 2
Biostabilité de différents types d'ADN dans le sérum humain en fonction du temps.
En A, un plasmide a été incubé dans du sérum humain pendant le temps indiqué puis a été déposé sur un gel 0,8 % agarose afin de pouvoir observer la dégradation subie dans le sérum.
En B, un duplexe linéaire de 22 pb a été incubé dans du sérum humain pendant le temps indiqué puis a été déposé sur un gel dénaturant avec 20 % d'acrylamide afin de pouvoir observer la dégradation subie dans le sérum.
En C, un minicercle relâché de 95 pb (pistes 5 à 10) et un minicercle surenroulé de 95 pb (pistes 11 à 16) ont été incubés dans du sérum humain pendant le temps indiqué puis ont été déposés sur un gel dénaturant avec 5 % d'acrylamide afin de pouvoir observer la dégradation subie dans le sérum. Les pistes 1 à 4 sont des marqueurs de référence. La piste 1 correspond à un oligonucléotide de 95 nt. La piste 2 correspond à un cercle sb de 95 bases. La piste 3 correspond à un cercle db de 95 pb. La piste 4 montre la déshybridation d'un cercle ouvert de 95 pb en une forme cercle sb de 95 bases plus un oligonucléotide de 95 bases.
En D, chaque courbe montre le pourcentage de stabilité dans le sérum de chaque espèce préalablement déposée sur gel en fonction du temps. Les quantités de produits sont déterminées selon l'intensité des bandes visibles avec un phosphoimageur. La stabilité du produit est déterminée en fonction de la dégradation du produit initial.

B/ Interaction *in vitro* minicercle/NF-κB

Dans la première partie de cette thèse, nous avons montré que NF-κB$(p50)_2$ se fixe à un minicercle d'ADN de 95 pb contenant le site de reconnaissance du gène de la chaîne légère K (Ig-κB) de séquence GGGACTTTCC. Ce site de reconnaissance a déjà été utilisé pour étudier l'activité de reconnaissance de NF-κB$(p50)_2$[256] et la constante de dissociation a une valeur située entre 30 et 60 nM en utilisant un ADN linéaire. Nous avons trouvé que la concentration de protéine correspondant à 50 % de minicercle retardé est d'environ 20 nM. Cela suggère que le site Ig-κB est reconnu avec la même affinité par NF-κB$(p50)_2$ dans un minicercle et dans un ADN linéaire.

Lorsque la même expérience d'interaction est réalisée avec un cercle de 95 pb contenant 2 sites Ig-κB (Figure 3A), on observe l'apparition d'une deuxième bande retardée (B2) de migration plus lente que celle observée avec le cercle contenant un seul site (bande B1). Cela indique la formation d'un complexe de 2 protéines par minicercle (bande B2). Pour une concentration de 60 nM de NF-κB$(p50)_2$, la bande B2 est très majoritaire (80 %) et à une concentration de 80 nM, la totalité de l'ADN est complexée sous la forme d'un complexe 2 protéines par minicercle.

Nous avons vérifié que les interactions observées sont spécifiques. En effet, en utilisant un minicercle non spécifique pour NF-κB en particulier (Figure 3B) (conçu pour avoir un score d'interaction minimum avec des facteurs de transcription des banques TESS et Jaspar), aucune bande retardée n'apparaît montrant que les interactions étudiées dans ces expériences sont spécifiques.

Pour le moment, nous n'avons pas comparé l'interaction de NF-κB$(p50)_2$ avec un ADN linéaire et un ADN circulaire dans les mêmes conditions expérimentales. Cette étude permettrait de vérifier si la courbure de l'ADN induite dans un minicercle entraîne une modulation de l'affinité de la protéine. Comme remarqué plus haut, nous n'attendons pas de variation très significative quand on compare les résultats de la littérature (ADN linéaire) aux nôtres (minicercles). Enfin, des expériences préliminaires suggèrent que la reconnaissance de

NF-κB pour un cercle relâché et surenroulé (ΔLk de -1) est la même, suggérant que le site de fixation peut être reconnu normalement dans un cercle déformé par contrainte topologique.

Par représentation moléculaire, nous avons commencé à étudier comment 2 protéines NF-κB étaient orientées sur le minicercle de 95 pb possédant les 2 sites κB comme indiqué dans la Figure 4A. Les figures 3D et 3E indiquent que les 2 protéines sont fixées sur le minicercle sans que les chaines latérales des côtés N- et C-ter de chaque protéine interagissent entre elles. Dans cette étude préliminaire, le minicercle d'ADN reste sous forme relâché. Nous poursuivons ce travail en validant notre représentation moléculaire par l'étude d'interaction minicercle/NF-κB où nous faisons varier la distance et le nombre de sites de liaison dans le minicercle.

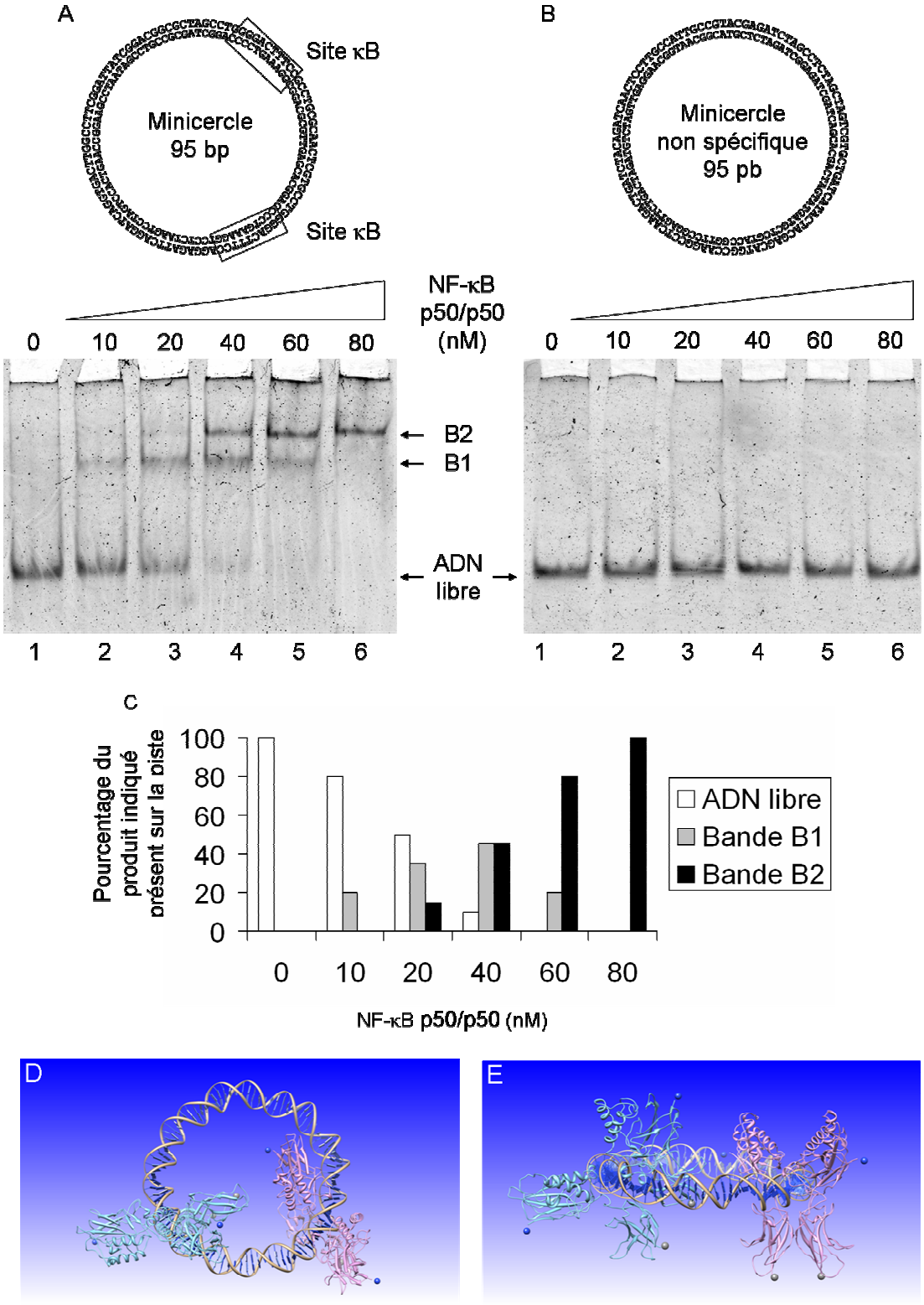


Figure 3.
Gels retard montrant l'interaction des minicercles possédant 2 (A) ou aucun (B) site de reconnaissance de NF-κB avec la protéine NFκB p50/p50. Les minicercles ont été incubés avec des quantités croissantes de NFκB tel qu'indiqué au dessus de chaque piste puis ont été déposés sur un gel 5% acrylamide.
En C, quantification du pourcentage de chaque bande visible sur le gel A.
En D et en E, représentation moléculaire montrant la fixation de 2 protéines NF-κB sur le minicercle de 95 pb possédant 2 sites de reconnaissance κB. En D, vue de dessus. En E, vue de face. Les boules grises correspondent aux extrêmités C-term et les boules bleues aux extrêmités N-term.

C/ Vectorisation d'un minicercle d'ADN de 95 pb par la Lipofectamine 2000

Les minicercles ayant une masse moléculaire proche des leurres moléculaires linéaires déjà utilisés avec la Lipofectamine 2000, nous avons commencé à utiliser la Lipofectamine 2000 comme agent de vectorisation des minicercles. La Lipofectamine 2000 est un liposome cationique servant de vecteur conçu à l'origine pour permettre la délivrance de plasmides dans les cellules. Au cours des dernières années, ce produit de transfection est devenu une référence puisque le nombre de publication utilisant ce vecteur a subi une croissance exponentielle de 1999 à 2008 (invitrogen.com). Ces dernières années, ce vecteur a aussi été utilisé pour permettre l'internalisation de siRNA. Certaines équipes l'ont également utilisé pour permettre l'internalisation cellulaire de leurres moléculaires[257,258]. Dans cette étude, le ratio 1 de Lipofectamine 2000 est défini comme étant 1 µL de Lipofectamine 2000 pour 1 µg d'ADN minicercle.

1/ Complexe Lipofectamine 2000 – minicercle (lipoplexe)

Afin de connaître la quantité adéquate de Lipofectamine 2000 pour complexer les minicercles d'ADN, nous avons ajouté des quantités croissantes de Lipofectamine 2000 à un minicercle de 95 pb. Pour étudier la formation des lipoplexes, nous avons ensuite déposé le mélange réactionnel sur un gel d'acrylamide (Figure 4). Lorsque l'ADN est libre (Piste 2), il n'y a qu'une seule bande visible. Lorsque l'on ajoute une faible quantité de Lipofectamine 2000 (ratios 0,1 et 0,5), l'intensité de la bande correspondant à l'ADN libre diminue et une bande correspondant aux complexes Lipofectamine 2000 / minicercle (lipoplexes) qui ne migrent pas apparaît dans le puits. Lorsque l'on augmente le ratio de Lipofectamine 2000 (ratio 1), la bande correspondant à l'ADN libre disparaît et la bande correspondant aux lipoplexes augmente. Ce résultat indique que les minicercles d'ADN sont complexés par la Lipofectamine 2000. En effet, la taille d'un lipoplexe est beaucoup plus importante que la taille d'un minicercle d'ADN seul. Par conséquent, le complexe est trop gros pour pouvoir migrer dans le gel. Si l'on augmente la quantité de Lipofectamine 2000 à un ratio de 2, la bande correspondant à l'ADN libre n'est plus visible et la bande correspondant au lipoplexes diminue par rapport à celle observée dans le cas du ratio 1. Dans ce cas, la complexation est telle que le colorant de l'ADN ne peut plus accéder à l'ADN pour le marquer. On peut donc conclure, que pour complexer complètement un minicercle d'ADN, il faut utiliser au minimum un ratio 1 avec la Lipofectamine 2000.

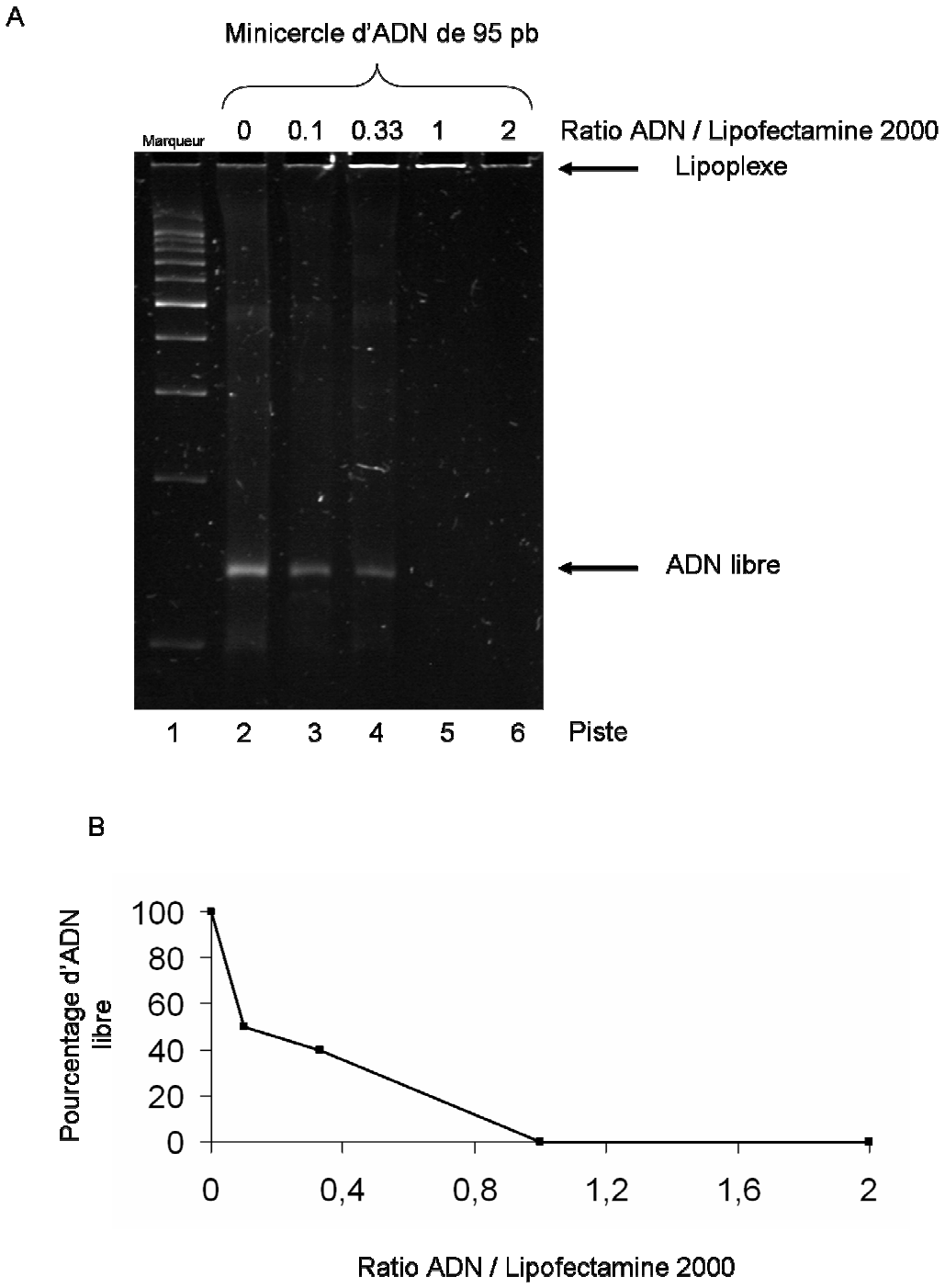


Figure 4.
En A, gel retard des complexes minicercles d'ADN 95 pb avec la Lipofectamine 2000. Les minicercles d'ADN ont été complexés avec le ratio de Lipofectamine 2000 indiqué puis ont été déposés sur un gel avec 5 % acrylamide. La piste 2 montre la migration d'un minicercle non complexé avec la Lipofectamine 2000. Lorsque l'on augmente la quantité de Lipofectamine 2000, une bande retardée apparaît dans le puits et correspond au complexe minicercle-Lipofectamine 2000 qui est d'une taille trop importante pour migrer dans le gel.
Le pourcentage d'ADN libre dans chaque condition de complexation est représenté sur l'histogramme en B.

2/ Délivrance intracellulaire d'un minicercle

Afin d'étudier la délivrance intracellulaire des lipoplexes, des cellules HEK293-NFluc ont été transfectées avec des lipoplexes minicercle 95 pb marqué à la fluorescéine / Lipofectamine 2000 (ratio 1) puis une observation au microscope confocal a été réalisée (Figure 5). On observe que les cellules ont internalisé le minicercle. La présence d'une fluorescence diffuse et homogène dans le cytoplasme serait en faveur d'une localisation cytosolique des minicercles. Dans la majorité des cellules, on ne détecte pas de minicercles d'ADN dans le noyau.

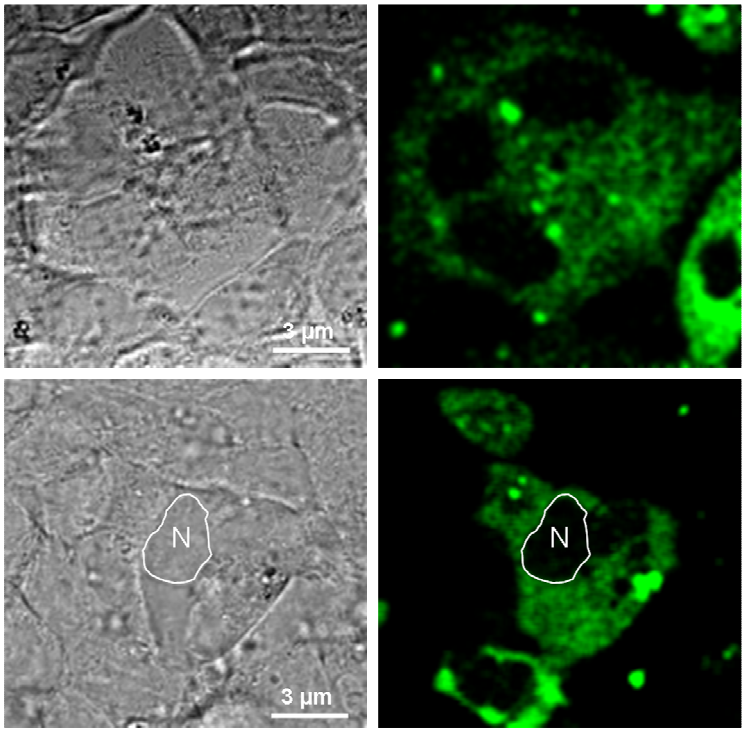


Figure 5.
Localisation intracellulaire d'un minicercle marqué à la fluoresceine et internalisé à l'aide de la Lipofectamine 2000 (ratio 1) dans des cellules Hek293-NFluc. Des cellules Hek293-NFluc ont été transfectées avec des complexes 50 nM de minicercles d'ADN de 95 pb marqués à la floresceine (vert) / ratio 1 de lipofectamine 2000 puis ont été observées 4 heures après le début de la transfection.

3/ Survie des cellules en fonction du ratio de transfection ADN / Lipofectamine 2000

Afin de déterminer la survie des cellules après la transfection, les cellules HEK293-NFluc ont été transfectées avec les lipoplexes minicercle 95 pb / Lipofectamine 2000 selon différents ratios puis un test de survie cellulaire à l'Alamar Blue a été réalisé 24 heures après transfection. On constate que plus le ratio de lipofectamine 2000 est élevé, plus la survie

cellulaire diminue (Figure 6). A un ratio 0,1, la survie est de 100 % mais à un ratio 0,33, la survie commence à diminuer. A un ratio 1, la survie n'est que de 25 %. Afin de se placer dans des conditions où la survie des cellules est au minimum de 80 %, les minicercles seront donc complexés avec la Lipofectamine 2000 avec un ratio 0,33 afin de déterminer l'effet du leurre moléculaire circulaire sur la transcription NF-κB dépendante.

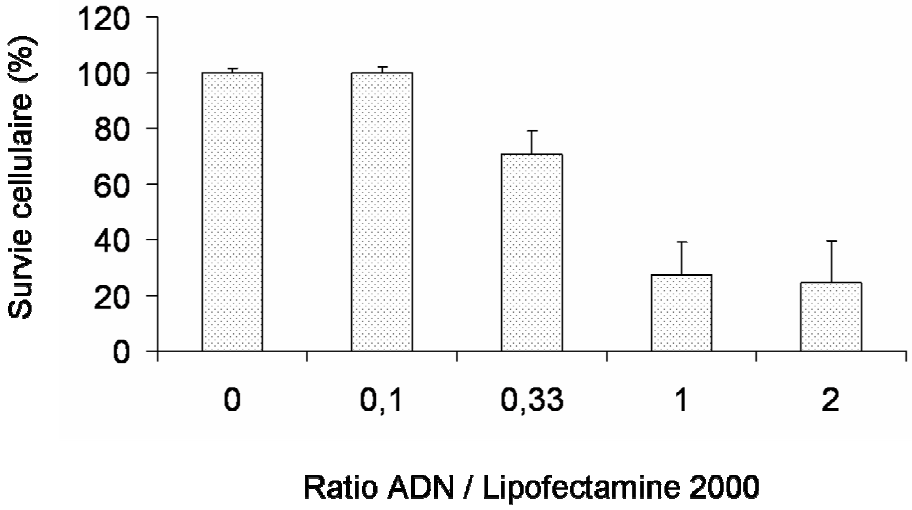


Figure 6.
Pourcentage de survie de cellules Hek293-NFluc en fonction des conditions de transfection avec la Lipofectamine 2000. Les cellules Hek293-NFluc ont été transfectées avec des complexes 50 nM minicercles / Lipofectamine 2000 à différents ratios et la survie cellulaire à été déterminées à l'aide de l'Alamar Blue.

4/ Etude de l'inhibition de la transcription par un minicercle leurre moléculaire contenant 2 séquences Ig-κB

Afin d'étudier l'effet d'inhibition de la transcription des minicercles ciblant NFκB, les cellules HEK293-NFluc ont été transfectées avec la Lipofectamine 2000 seule ou bien complexée avec soit un minicercle comportant 2 séquences consensus de liaison à NFκB, soit un minicercle non spécifique (Figure 7). Le ratio de Lipofectamine 2000 utilisé est 0,33. Aucune diminution spécifique de la quantité de luciférase produite n'a été observée.

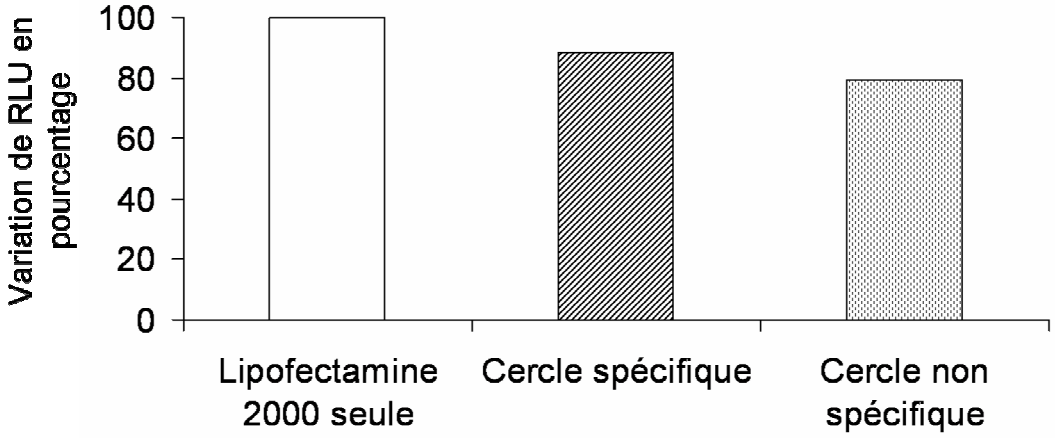


Figure 7.
Dosage luciférase des cellules Hek293-NF luc transfectées avec la lipofectamine 2000 seule ou complexée avec des minicercles. Le ratio de lipofectamine 2000 utilisé est 0,33. En blanc, la transfection des cellules avec la lipofectamine 2000 seule sert de référence et est placée à 100 %. La variation de luciférase due au cercle spécifique comportant 2 séquences consensus de NF-κB est représentée par les barres hachurées. La variation de luciférase due au cercle scramble (non spécifique) est représentée par les barres avec des points.

La complexation optimale des minicercles avec la Lipofectamine 2000 s'effectue à un ratio 1 comme montré par gel retard. Avec ces conditions de complexation, la transfection des minicercles semble efficace avec les cellules HEK293. On constate également par microscopie confocale que la majorité des cellules sont toujours en vie, ce qui n'est pas en accord avec l'expérience de survie cellulaire. Cependant, la localisation des minicercles par microscopie confocale est réalisée 4 heures après transfection tandis que la survie cellulaire est réalisée 24 heures après transfection. Cette différence de temps peut expliquer cette contradiction. Toutefois, on constate que la survie cellulaire en présence des complexes dans ces conditions est très élevée (environ 20 %). Par conséquent, l'utilisation de la Lipofectamine 2000 à ce ratio de complexation avec les minicercles est inadéquate pour la délivrance dans des cellules HEK293. Afin de transfecter les cellules HEK293 avec une baisse de survie moins importante, la quantité de Lipofectamine 2000 a été diminuée (ratios 0,1 et 0,33). Bien que la complexation du minicercle observée par gel retard ne soit pas totale, la survie cellulaire observée après 24h est beaucoup plus importante puisqu'elle est de 100 % avec un ratio 0,1 et qu'elle est de 70 % avec un ratio 0,33. Au cours de la délivrance des minicercles possédant la séquence consensus NF-κB ou des minicercles non spécifiques, aucun effet spécifique du minicercle n'a été observé sur l'inhibition de la transcription NF-κB dépendante en utilisant le système rapporteur exprimant la firefly luciferase. Dans la mesure où le test d'activité a été réalisé alors que la complexation de la lipofectamine 2000 avec les minicercles n'était pas totale, il est possible que l'internalisation des minicercles dans la cellule soit trop

faible pour obtenir un effet leurre du minicercle spécifique. La recherche d'un vecteur complexant les minicercles sans que les complexes induisent une baisse de la survie cellulaire trop forte est donc nécessaire.

Sachant que la Lipofectamine 2000 est traditionnellement utilisée pour transfecter de l'ADN plasmidique dans les cellules et que les minicercles d'ADN sont d'une taille très inférieure (environ 50 fois), nous avons cherché d'autres vecteurs sur 2 critères : 1) Complexation *in vitro* ; 2) la survie cellulaire. Tout d'abord, la vectorisation d'un minicercle d'ADN avec un vecteur utilisé pour la délivrance d'un siRNA (taille environ 4 fois plus petite) a été évaluée.

D/ Vectorisation d'un minicercle par le SiPort

Le SiPort est une formulation lipidique commerciale pour permettre la transfection de siRNA dans les cellules de mammifères. Malgré le fait que la structure de la double hélice d'ADN et d'ARN soit différente, la taille d'un minicercle est de l'ordre de grandeur de celle d'un siRNA. Par conséquent, l'utilisation de ce produit pour permettre l'internalisation des minicercles a été évaluée. Un ratio 1 de SiPort correspond à 1 µL de SiPort pour 200 ng d'ADN minicercle.

1/ Complexe SiPort – minicercle

Afin de déterminer le ratio nécessaire pour complexer un minicercle d'ADN avec du SiPort, un gel retard a été réalisé. Lorsque l'ADN n'est pas complexé avec le SiPort, il n'y a qu'une seule bande visible correspondant à l'ADN libre (Figure 8 Piste 2). Lorsque l'on rajoute une faible quantité de SiPort (Ratios 0.25 et 0.5), l'intensité de la bande correspondant à l'ADN libre diminue et une bande correspondant à la complexation du SiPort avec le minicercle apparaît dans le puits. Le complexe, ayant une taille trop importante, ne migre pas dans le puits. Lorsque l'on augmente le ratio de SiPort (ratio 1), la bande correspondant à l'ADN libre n'est plus présente et seule la bande correspondant au complexe minicercle / SiPort est visible dans le puits. Ceci signifie qu'au ratio 1 de SiPort, l'intégralité des minicercles d'ADN est complexée au SiPort. On peut donc conclure, que pour complexer en totalité les minicercles d'ADN, il faut utiliser le SiPort à un ratio 1.

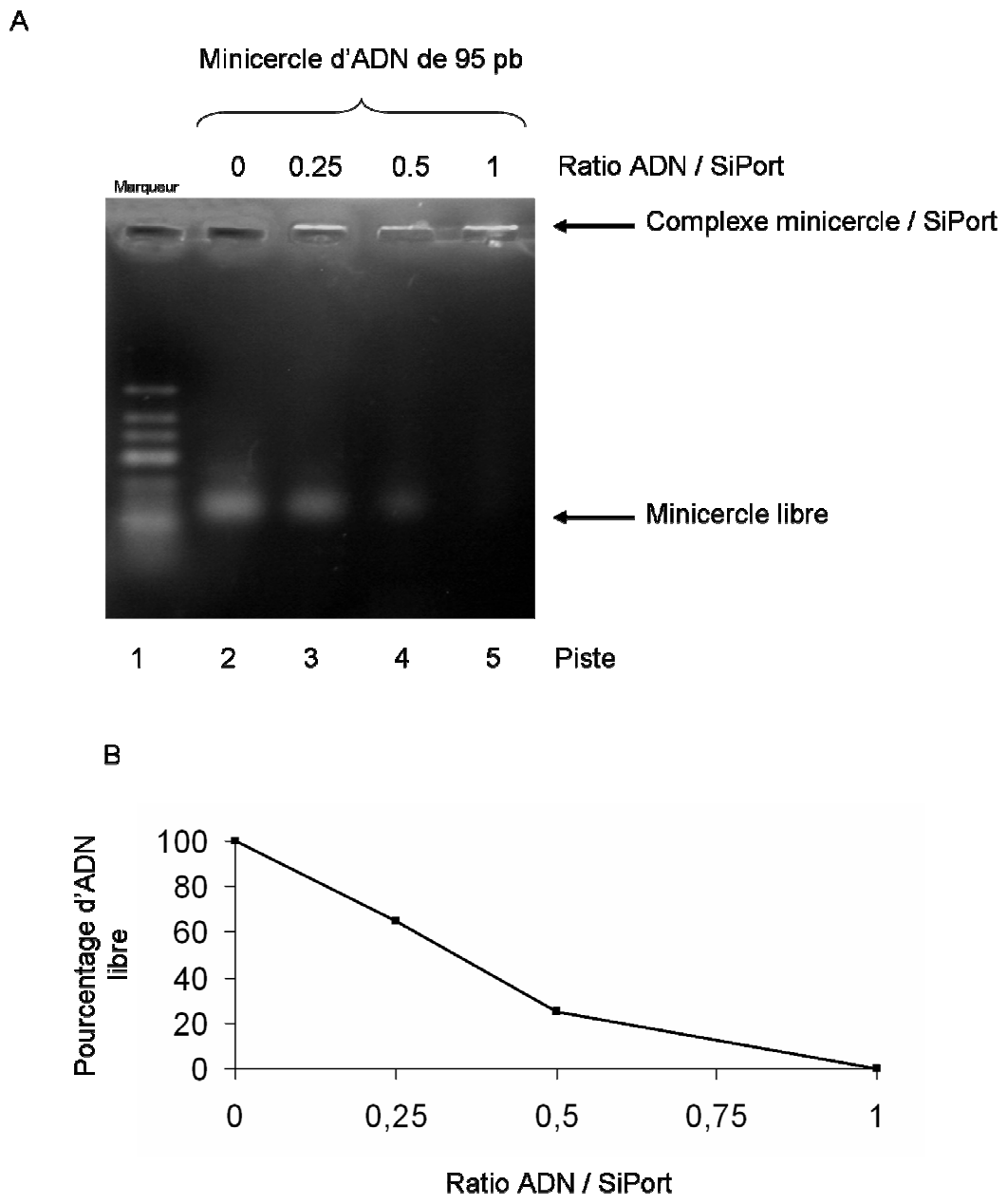


Figure 8.
En A, gel retard des complexes minicercles d'ADN 95 pb avec le SiPort. Les complexes ont été réalisés en incubant un minicercle d'ADN avec différents ratios de SiPort tels qu'indiqués au dessus de chaque piste puis ont été déposés sur un gel 1% agarose. La piste 2 montre un minicercle non complexé avec du SiPort. Les pistes 3 à 5 montrent la diminution de la bande correspondant à l'ADN libre de départ au profit d'une nouvelle bande qui apparaît dans le puits, d'une taille trop importante pour migrer dans le gel, et qui correspond à un complexe minicercle / SiPort.
En B, quantification du pourcentage d'ADN libre lors de la complexation d'un minicercle avec le ratio indiqué de SiPort.

2/ Internalisation intracellulaire d'un minicercle d'ADN

Afin d'étudier l'internalisation des complexes dans les cellules HEK293-NFluc, les cellules ont été transfectées avec 50 nM de minicercle marqué avec une fluorescéine complexé avec du SiPort au ratio indiqué. 24 heures après le début de la transfection, les cellules sont décollées puis l'intensité de fluorescence moyenne, reflétant la quantité moyenne de minicercle internalisée dans les cellules, est déterminée par cytométrie en flux. On constate que lorsque les complexes transfectés sont formés avec un ratio 0,5 de SiPort, l'intensité moyenne de fluorescence dans les cellules est d'environ 8 U.A. (unités arbitraires). Lorsqu'ils sont formés avec un ratio 1 de SiPort, l'intensité moyenne de fluorescence dans les cellules augmente à environ 14 U.A. Il est cependant nécessaire de nuancer ces résultats. En effet, les valeurs obtenues ne sont que de 3 et 6 fois la valeur d'auto fluorescence des cellules (2,4 U.A.). Par conséquent, il est impossible d'affirmer qu'il y ait une délivrance des complexes de façon significative dans les cellules Hek293-NFluc. Aussi une vérification de l'internalisation des minicercles dans les cellules a été réalisée par microscopie confocale.

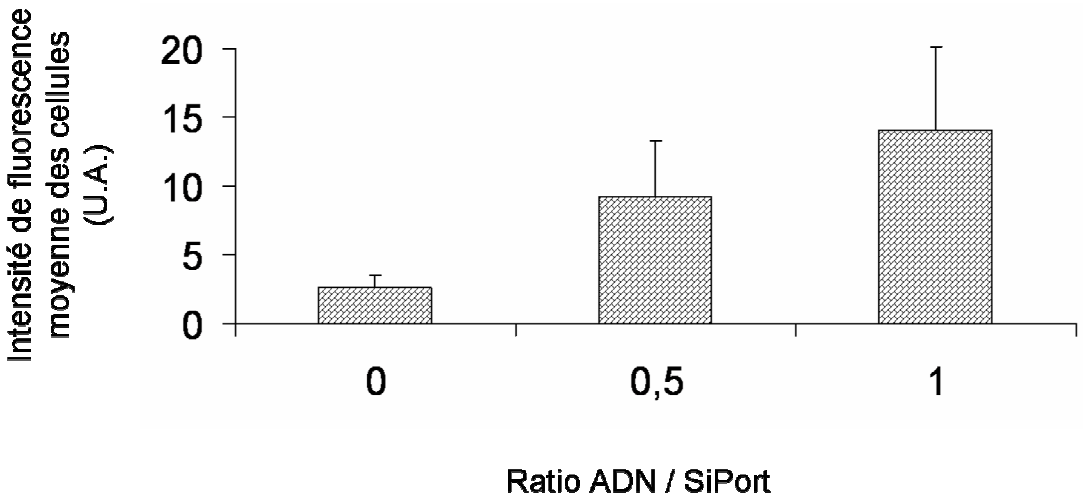


Figure 9.
Internalisation des complexes minicercles / SiPort dans des cellules HEK293-NFluc. Les complexes composés de 50 nM de minicercles marqués avec une fluorescéine et de SiPort au ratio indiqué ont été formés puis incubés avec les cellules. 24h après le début de la transfection, les cellules sont décollées puis l'intensité de fluorescence moyenne des cellules est déterminée par cytométrie en flux.

3/ Localisation d'un minicercle d'ADN dans une cellule

Afin d'observer la distribution intracellulaire des minicercles vectorisés à l'aide du SiPort, les cellules HEK293 ont été transfectées avec 50 nM de minicercle marqué à la fluorescéine complexés au SiPort avec un ratio 1, puis ont été observées au microscope

confocal 4 heures après le début de la transfection (Figure 10). On observe que la grande majorité des complexes sont agrégés et se fixent sur la membrane cellulaire (Figure 10, flèches blanches).

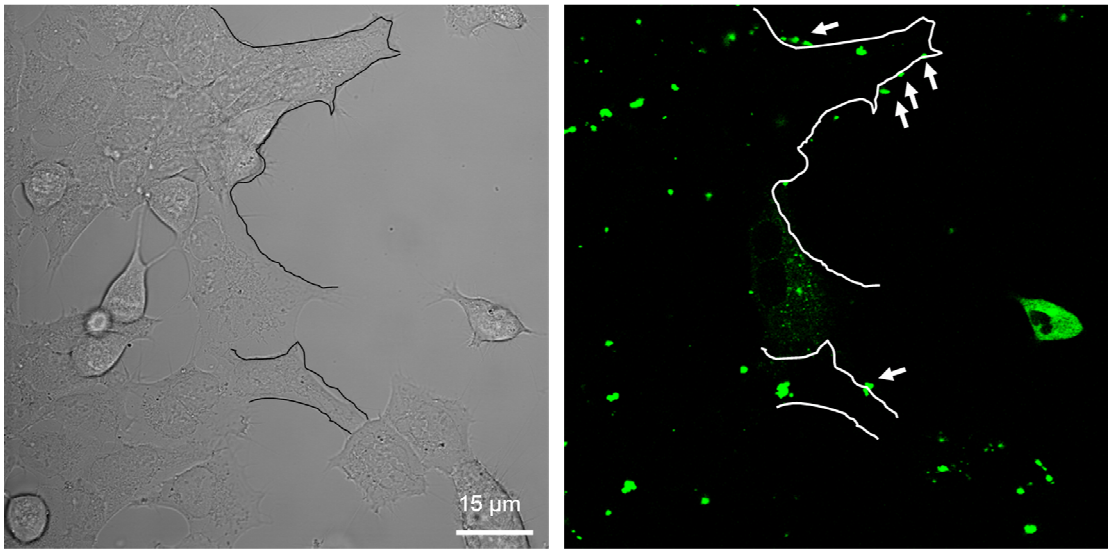


Figure 10.
Cellules Hek293-NF-luc transfectées avec des complexes 50 nM minicercles d'ADN de 95 pb marqués à la fluorescéine (vert) / SiPort ratio 1. Les cellules ont été transfectées pendant 4h avec ces complexes puis ont été observées au microscope confocal. Les flèches blanches montrent des minicercles non internalisés et regroupés sur la membrane plasmique des cellules.

D'après ces résultats, le ratio de SiPort qui correspond à la complexation de l'intégralité du minicercle, évalué via un gel retard, est de 1. Par microscopie confocale, il a pu être observé qu'un complexe 50 nM de minicercle marqués avec une fluorescéine / ratio 1 de SiPort n'est pas internalisé dans des cellules Hek293-NFluc, malgré le fait que le cercle soit intégralement complexé.

Ainsi, le SiPort ne semble pas un vecteur adéquat pour permettre l'internalisation des minicercles dans les cellules, bien qu'une complexation optimale du minicercle puisse être réalisée.

Il semblerait donc, malgré le fait de n'avoir testé que 2 liposomes, que la complexation des minicercles avec des lipides cationiques ne permette pas le transfert optimal des minicercles d'ADN dans une cellule afin d'obtenir un effet inhibiteur sur la transcription NF-κB dépendante. Par conséquent, nous avons évalué la vectorisation des minicercles d'ADN avec un polymère cationique.

E/ Vectorisation d’un minicercle d’ADN 95pb par le PTG1

Le PTG1 est un polymère cationique composé de polyéthyléneimine (PEI) linéaire sur laquelle sont greffés des groupements histidines qui permettent, après protonation dans les endosomes, de provoquer l’échappement des complexes de transfection vers le cytosol. On définit que le ratio 1 de PTG1 correspond à 1 µL de PTG1 pour 1 µg d’ADN minicercle, le ratio N/P calculé (Charges positives [azotes] / charges négatives [phosphates]) est de 7.

1/ Complexes PTG1-minicercle (polyplexe)

Comme précédemment avec les autres vecteurs, une recherche de la quantité nécessaire de PTG1 pour complexer intégralement les minicercles a été étudiée à l’aide d’un gel retard (Figure 11). La migration du minicercle non complexé avec le PTG1 est présentée sur la piste 2. Lorsque le minicercle est complexé avec un ratio 0,1 de PTG1 (piste 3), on observe une diminution de l’intensité de la bande d’ADN libre et une trainée correspondant à une interaction entre le PTG1 et l’ADN ne conduisant pas à une agrégation ou condensation. Lorsque le minicercle est complexé avec des ratios plus importants de PTG1 (Ratio 0,33, Piste 4 et Ratio 1, Piste 5), le minicercle est complexé au PTG1 puisqu’il n’y a plus d’ADN libre visible et que seul un complexe minicercle/PTG1 est visible au niveau du puits. Dans le cas des ratios 0,33 et 1, le nombre de molécules de PTG1 qui sont utilisées pour la complexation du minicercle est plus important ce qui augmente par conséquent la taille et donc ne permet plus la migration au sein du gel. On peut conclure que pour complexer de façon optimale les minicercles avec le PTG1, l’utilisation d’un ratio à partir de 0.1 semble possible.

.

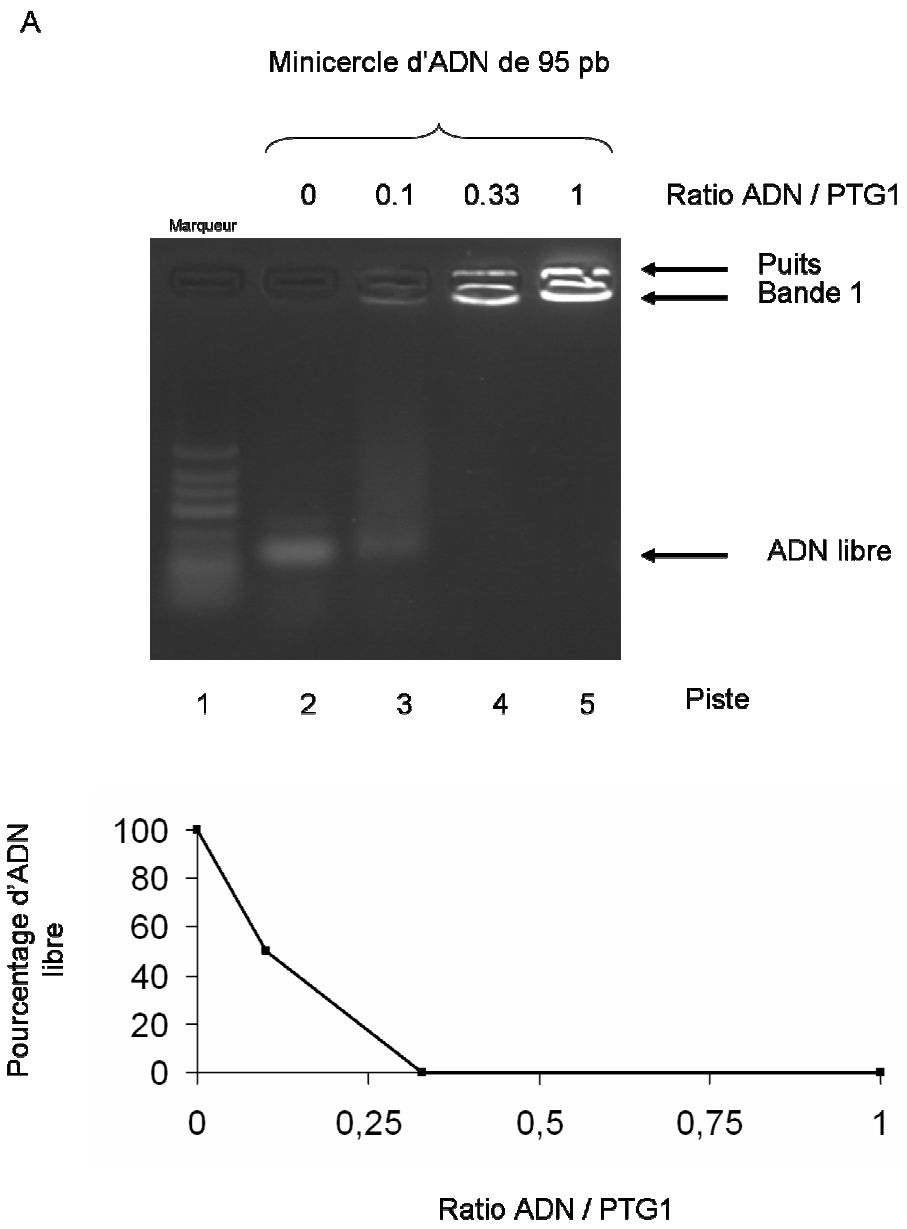


Figure 11.
En A, gel retard des complexes minicercles d'ADN 95 pb avec le PTG1. Les complexes minicercles/PTG1 ont été formés selon le ratio de PTG1 indiqué puis ont été déposés sur un gel retard d'agarose 2 %. La piste 2 montre un minicercle non complexé avec du PTG1. Les pistes 3 à 5 montrent la complexation d'un minicercle avec une quantité croissante de PTG1.
En B, quantification du pourcentage d'ADN libre lors de la complexation d'un minicercle avec du PTG1 au ratio indiqué.

2/ Internalisation intracellulaire des minicercles d'ADN

Afin d'étudier l'effet de la quantité de PTG1 sur l'internalisation des minicercles dans les cellules HEK293-NFluc, les cellules ont été transfectées avec des complexes formés avec 50 nM d'un minicercle marqué avec une fluorescéine et des ratios différents de PTG1. 24 heures après le début de la transfection, l'intensité moyenne de fluorescence dans les cellules a été évaluée par cytométrie en flux. L'intensité de fluorescence associée aux cellules augmente en fonction du ratio de PTG1 (figure 12). A 0,05, la fluorescence moyenne est de 16 U.A ; à 0,1, elle est de 18 U.A. ; à 0,33, elle est de 34 U.A. et à 1, la fluorescence moyenne est de 114 U.A. On peut donc conclure que la quantité de PTG1 utilisé pour former les complexes a un effet positif sur l'efficacité d'internalisation intracellulaire d'un minicercle. D'après ces observations, le ratio 1 est le plus efficace pour internaliser un minicercle dans les cellules HEK293-NFluc.

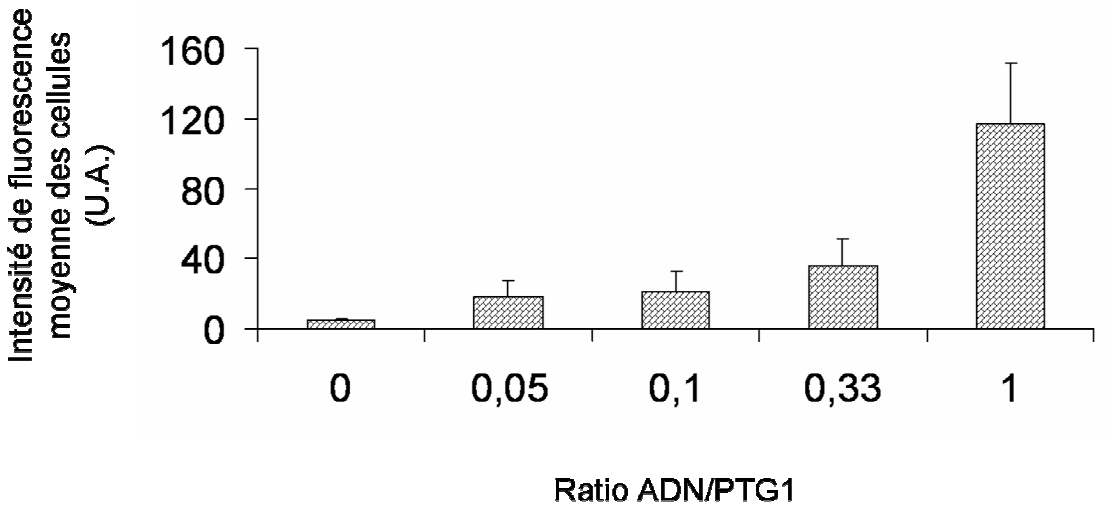


Figure 12.
Internalisation du complexe minicercle d'ADN/PTG1 dans des cellules Hek293-NFluc. Des complexes formés entre 50 nM de minicercle marqué avec une fluorescéine avec un/ ratio indiqué de PTG1 ont été transfectés dans des cellules Hek293-NFluc. 24h après le début de la transfection, l'internalisation des complexes dans les cellules est évaluée par cytométrie en flux et exprimé par l'intensité de fluorescence moyenne des cellules.

3/ Localisation intracellulaire d'un minicercle d'ADN

Afin d'étudier la localisation d'un miniercle dans une cellule après transfection, les cellules HEK293-NFluc ont été transfectées avec 50 nM de minicercle 95 pb marqué à la fluorescéine complexés avec du PTG1 (Ratio 1), puis une observation au microscope confocal a été réalisée 4 heures après le début de la transfection (Figure 13). On observe une

fluorescence diffuse dans le cytoplasme des cellules et d'autre part qu'un minicercle est localisé dans le cytosol.

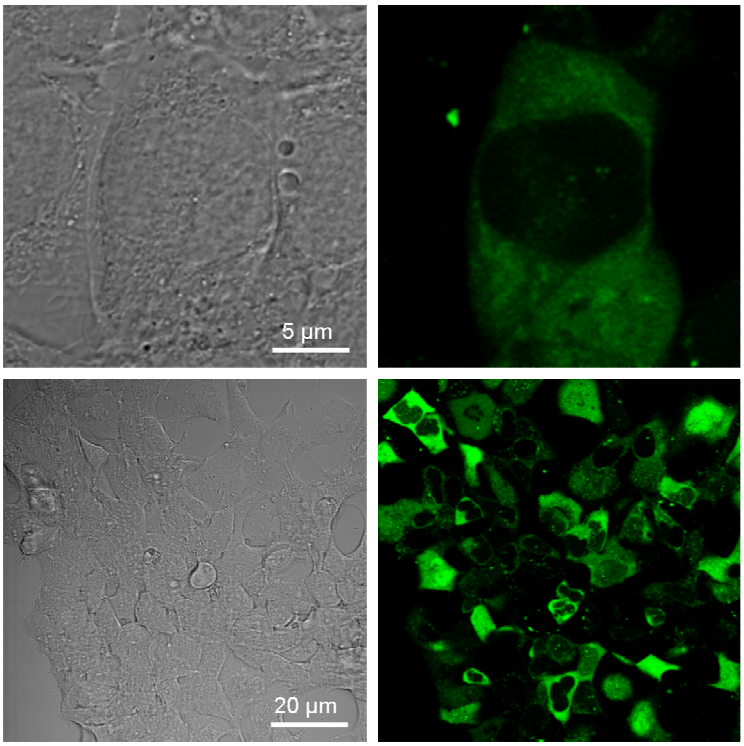


Figure 13.
Cellules Hek293-NF-luc transfectées avec des complexes PTG1/ minicercles d'ADN de 95 pb marqués à la fluorescéine (vert) Des cellules Hek293 ont été transfectées avec un polyplexe 50 nM de minicercles marqués avec une fluorescéine / Ratio 1 de PTG1. Une observation au microscope confocal a été réalisée 4 heures après le début de la transfection.

4/ Survie des cellules selon les conditions de transfection avec le PTG1

Afin de s'assurer que les polyplexes n'induisent pas une baisse de survie cellulaire trop importante, un test de survie cellulaire à l'Alamar Blue a été réalisé 24 heures après la transfection des cellules HEK293-NFluc avec 50 nM de minicercle 95 pb complexés au PTG1 selon différents ratios (Figure 14). La quantité de PTG1 ayant servi à réaliser les complexes a un impact sur la survie cellulaire puisque lorsque le ratio est de 0,33 ou de 1, la survie cellulaire est d'environ seulement 40 %. Cependant, si le ratio est de 0,1, la survie est importante (96 %). La baisse de survie cellulaire ne semble pas due à la présence du minicercle puisque lorsque les cellules sont incubées en présence de PTG1 seul, la survie est la même qu'en présence de minicercle. Nous concluons que l'utilisation du PTG1 à un ratio 0,1 est possible. En effet, les polyplexes se forment à ce ratio comme décrit sur le gel retard et ne semblent pas s'agréger et la survie cellulaire des cellules HEK293-Nfluc est très élevée.

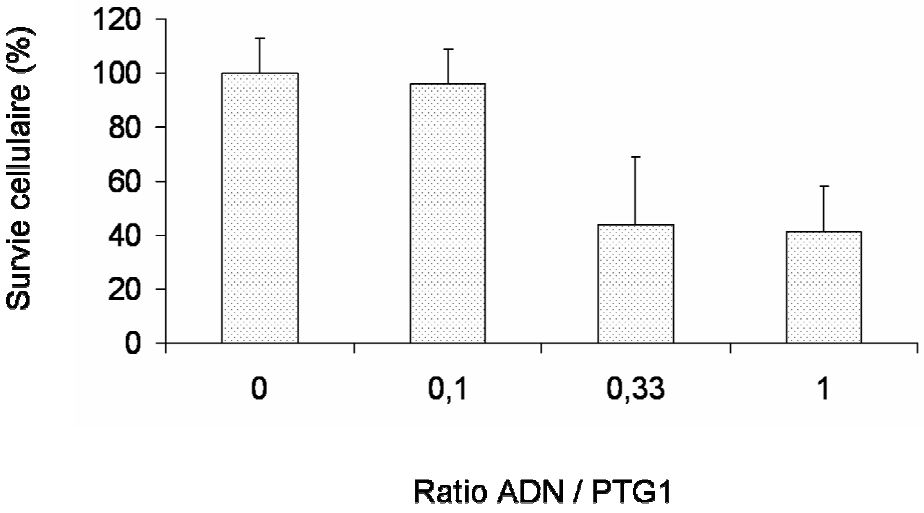


Figure 14.
Pourcentage de survie des cellules HEK 293-NFluc en fonction des ratios de PTG1 ayant servi à la formation du complexe de transfection. 50 nM de minicercles ont été formés avec le PTG1 selon les ratios indiqués puis incubés avec les cellules pendant 4 heures. 24 heures après le début de transfection, la survie cellulaire a été déterminée.

5/ Effet sur la transcription NF-κB dépendante d'un minicercle possédant 2 séquences de reconnaissance de Ig-κB.

Pour montrer une activité leurre moléculaire induite par un minicercle possédant des sites Ig-κB, des cellules HEK293 exprimant de façon stable la firefly-luciferase sous le contrôle d'un promoteur TATA contenant en amont 6 éléments de réponse à NF-κB ont été transfectées avec 50 nM d'un minicercle ne ciblant aucun facteur de transcription (cercle non spécifique) ou ciblant NF-κB grâce à 2 séquences de liaison κB (cercle spécifique) à un ratio 0,1 de PTG1. Après transfection des minicercles, les cellules ont été stimulées avec la cytokine TNF-α qui induit une transcription NF-κB dépendante du gène rapporteur de la luciférase, puis un dosage de la luciférase a été effectué pour déterminer l'effet du minicercle spécifique et non spécifique sur l'expression de NF-κB (Figure 15). On constate que les cellules transfectées avec le minicercle spécifique possédant les séquences de reconnaissance de NF-κB expriment 40% de luciférase en moins par rapport aux cellules transfectées avec le PTG1 seul ou avec le cercle non spécifique. On peut donc conclure que le minicercle possédant les séquences de liaison au facteur de transcription NF-κB ont un effet inhibiteur sur l'activité de NF-κB (Effet leurre moléculaire).

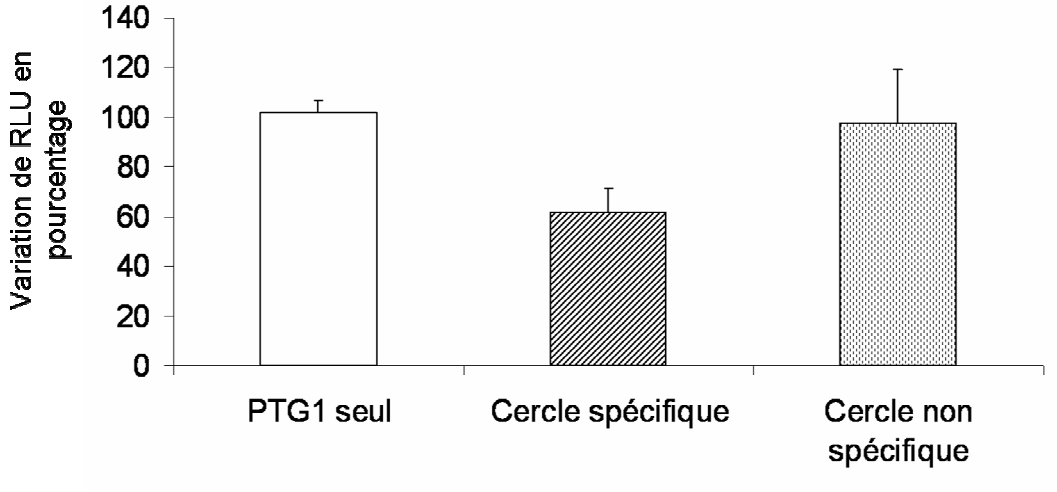


Figure 15.
Effet d'inhibition d'un minicercle sur la transcription NF-kB dépendante. Les cellules HEK293-NFluc ont été transfectées avec 50 nM de minicercles possédant 0 ou 2 séquences de liaison à NF-κB avec un ratio de PTG1 de 0,1. PTG1 seul (barre blanche), cercle spécifique (barre hachurée) 2 séquences consensus de reconnaissance de NF-κB, cercle non spécifique (barre avec points). Ce graphique représente une moyenne des valeurs de RLU obtenues à partir de 7 expériences indépendantes réalisées en triplicate.

Afin d'étudier si l'activité leurre moléculaire est dose dépendante, un complexe minicercle spécifique ou non spécifique / ratio 0,33 de PTG1 a été réalisé. Ce complexe a ensuite été utilisé à une concentration de 12.5 nM et 25 nM pour transfecter les cellules Hek293-NFluc comme précédemment. Comme on peut le voir sur la figure 16, on observe bien un effet inhibiteur spécifique de l'activité transcriptionnelle NF-κB dépendante par un minicercle et cet effet est dose dépendant puisque l'effet inhibiteur est environ deux fois plus fort lorsque la concentration de minicercle spécifique augmente d'un facteur deux. Des expériences de cytométrie sont en cours pour déterminer les valeurs d'internalisation de minicercle dans ces conditions expérimentales. Le minicercle possédant deux séquences de liaison au facteur de transcription NF-κB montre un effet leurre moléculaire dose dépendant comme indiqué par la baisse de l'activité transcriptionnelle NF-κB dépendante en utilisant le système rapporteur de la luciférase.

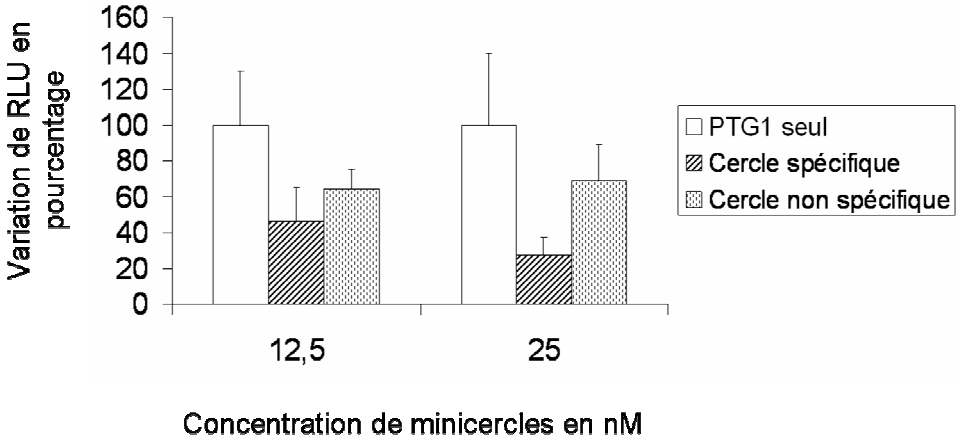


Figure 16.
Effet sur la transcription NF-κB dépendante d'un complexe minicercle spécifique ou non spécifique / ratio 0,33 de PTG1 selon la concentration déposée sur les cellules Hek293-NFluc. PTG1 seul (barre blanche), cercle spécifique (barre hachurée), cercle non spécifique (barre avec points).

Discussion et perspectives

Grâce à notre méthode de production versatile de minicercle d'ADN, nous avons commencé une étude sur les propriétés de ces minicercles dans le cadre du développement d'une application en thérapie génique concernant la stratégie du leurre moléculaire. Ce travail est divisé en trois points. D'abord, on sait que la biostabilité d'un acide nucléique utilisable en thérapie génique est une condition importante pour son efficacité thérapeutique. La forme circulaire de l'ADN en série phosphodiester confère à un minicercle une bonne biostabilité indépendemment de la contrainte toplogique de départ (demi-vie de 11 heures). La biostabilité sérique des minicercles est donc comparable à celle des ODN sous forme « dumbbell » utilisé à l'heure actuelle comme leurre moléculaire *in vivo* (environ 8h[259]). Pour le moment, nous n'avons pas testé la biostabilité d'un minicercle dans des extraits cellulaires mais on sait que l'activité nucléasique cellulaire est essentiellement exonucléasique[260] ; étant donné qu'un minicercle est complètement insensible à une activité exonucléasique, la biostabilité d'un minicercle dans une cellule devrait être supérieure à celle observée dans le sérum. Alors qu'un minicercle contraint est bien sensible à l'activité endonucléasique de la Bal31 (Figure 7, partie résultats brevetés) contrairement à un minicercle relaché, il est intéressant de remarquer que l'activité endonucléasique sérique est indépendante de la contrainte topologique d'un minicrecle. Il est possible que l'activité endonucléasique soit modulée par la présence de protéines sériques interagissant avec un minicercle.

Une autre partie de notre travail concerne une étude cellulaire sur l'inhibition de la transcription pour montrer qu'un minicercle contenant des sites de fixation d'un facteur de transcription possède une activité de leurre moléculaire. Nous avons choisi un système rapporteur stable donc intégré au génome cellulaire qui a été validé auparavant dans la recherche d'inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription dont NF-κB. A notre connaissance, ce système n'a pas été utilisé dans les études sur les leurres moléculaires bien qu'il présente l'avantage d'avoir un signal beaucoup plus robuste et physiologique comparé à celui obtenu par transfection transitoire. Concernant le système de vectorisation du minicercle, le polyplexe PTG1 a permis de délivrer un minicercle dans des conditions où la survie des cellules est préservée. En modulant la quantité de PTG1, nous avons montré qu'un minicercle de 95 pb possèdant deux sites κB inhibe spécifiquement l'activité transcriptionnelle NF-κB dépendante dans des conditions d'induction de cette protéine avec le TNF alpha. Pour un rapport de vecteur, la concentration de minicercle permettant d'inhiber NF-κB est particulièrement faible (25 nM) comparé aux concentrations généralement utilisées qui sont plutôt de l'ordre de 100 nM. Nos résultats montrent donc qu'un minicercle possèdant deux sites κB a une activité de leurre moléculaire anti-NF-κB.

Bien que nous n'ayons pas encore établi si ce minicercle interagit avec NF-κB dans un extrait cellulaire, nous avons montré que ce minicercle interagit efficacement avec NF-κB $(p50)_2$ *in vitro*, ce dimère étant une des formes les plus représentées *in cellulo* avec le dimère p50/p65. Ces résultats montrent qu'un minicercle peut être utilisé dans une stratégie leurre moléculaire et qu'un mutlticiblage est possible puisque le minicercle utilisé possède deux sites κB. Il serait important de comparer l'effet d'un leurre moléculaire de type « dumbell » possèdant un seul site κB avec un minicercle possèdant un ou plusieurs sites. La difficulté est de vectoriser si possible ces acides nucléiques avec un vecteur commun. Le PTG1 n'a pas permis de vectoriser un leurre moléculaire de type dumbell. Pour démontrer l'effet d'un pluriciblage de NF-κB, nous comparerons l'effet de minicercles possèdant un nombre croissant de sites κB sur la transcription NF-κB dépendante.

Dans la partie introduction de ce manuscrit, nous avons vu que selon le système de vectorisation, l'acide nucléique leurre moléculaire a une localisation intracellulaire cytoplasmique ou plutôt nucléaire. Dans notre étude, la vectorisation d'un minicercle avec le polyplexe PTG1 conduit à une localisation cytoplasmique du minicercle. L'activité leurre

moléculaire d'un minicercle aurait donc lieu essentiellement au niveau du cytoplasme selon un mécanisme de rétention du facteur de transcription NF-κB comme proposé par l'équipe du Pr. Rémi Fagard[95]. Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'une partie de l'activité ait lieu au niveau du noyau car le seuil de détection en microscopie confocale est probablement trop faible pour détecter la présence de minicercles dans le noyau.

Résultats en cours

2ème partie

Utilisation des minicercles comme plateforme d'interaction *in vitro* avec les facteurs de transcription NF-κB et Ets1

Utilisation des minicercles comme plateforme d'interaction *in vitro* avec les facteurs de transcription NF-κB et Ets1.

Dans la stratégie du leurre moléculaire, un duplexe d'ADN court contenant une séquence spécifiquement reconnue par un facteur de transcription cible permet son piégeage intracellulaire et en conséquence conduit à inhiber l'expression génique des gènes sous sa dépendance. La grande majorité des études menées sur cette stratégie ont consisté en l'inhibition d'un seul facteur de transcription. Un multiciblage de NF-κB et Ets1 a été reporté dans le but de réduire le risque d'anévrisme aortique abdominal dans un modèle animal (rat, lapin)[127,128]. Comme on peut le voir dans la Figure 1, l'oligonudéoxynucléotide leurre moléculaire de 26 paires de base contient ici les sites séparés de Ets1 et NF-κB ; cependant comme indiqué dans ce chapitre, la protéine Ets1 interagit très faiblement avec un seul site consensus du fait de son mécanisme d'autoinhibition. De plus, il n'a pas été montré que ce leurre a la capacité de fixer les deux facteurs de transcription en même temps.

(Ets1) (NF-κB)

ACCGGAAGTATGAGGGATTTCCCTCC
TGGCCTTCATACTCCCTAAAGGGAGG

Figure 1.
Séquence du leurre moléculaire multisites utilisé par l'équipe de Morishita. D'après Miyake et coll[128].

Dans la première partie de ma thèse, l'interaction entre un minicercle de 95 pb et la protéine NF-κB a été montrée (Voir chapitre Résultats 1ère Partie). Afin d'étudier la possibilité qu'aurait un minicercle de fixer différents facteurs de transcription, un minicercle possédant des sites de fixation de NF-κB et Ets1 ont été produits et l'interaction avec ces facteurs de transcription étudiée par la technique de retardement de migration électrophorétique.

Ets1 est un facteur de transcription qui active ou réprime l'expression de gènes qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques : prolifération cellulaire, différenciation, développement, transformation et apoptose[261]. Le site consensus reconnu par Ets1 est GGAA. Contrairement à de nombreux autres facteurs de transcription, l'activité de Ets1 est régulée d'une façon ADN-dépendant. Le mécanisme principal de régulation d'Ets1 est l'auto-inhibition, c'est-à-dire que la protéine Ets1 qui possède un domaine de liaison à l'ADN a une conformation qui masque ce domaine d'interaction. La fixation de Ets1 à l'ADN

est régulée soit par un partenaire protéique[262], soit par la présence d'une séquence d'ADN palindromique comme celle retrouvée dans le promoteur de la stromélysine-1 permettant la fixation coopérative de 2 Ets1[263] (Figure 2).

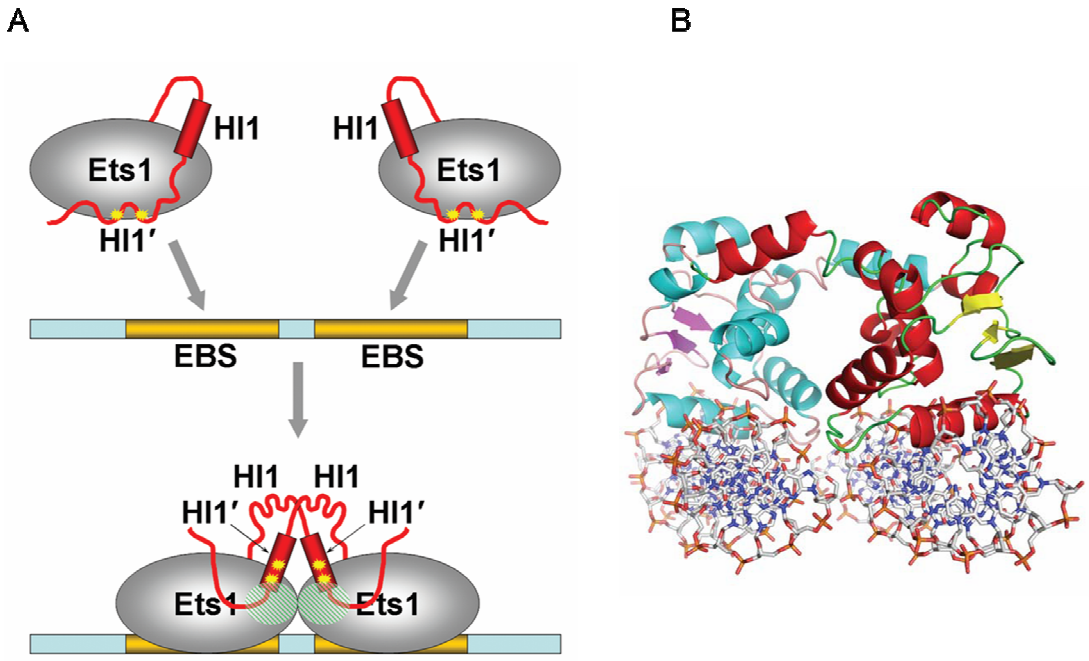


Figure 2.
Fixation de Ets1 sur une séquence d'ADN palindromique. En A, schéma montrant le contournement du système d'auto-inhibition[264]. L'hélice HI1 masque le domaine d'interaction avec l'ADN. Pour permettre la fixation d'Ets1 sur son site, l'hélice HI1 doit interagir avec une autre hélice HI1 située sur une autre protéine Ets1, le site de fixation à l'ADN est alors libre et 2 protéines Ets1 se fixent en même temps sur l'ADN. En B, structure de 2 protéines Ets1 fixées à l'ADN[265].

Il est donc difficile de cibler Ets1 à l'aide d'un leurre classique contenant un seul site de reconnaissance du fait du mécanisme d'auto-inhibition. Il faut inclure dans le leurre une séquence du type de celle trouvée dans plusieurs promoteurs comme celle du promoteur de la stromélysine qui est de 22 pb.

Etant donné que l'activation concomitante de NF-kB et Ets1 est impliquée dans plusieurs pathologies, nous avons commencé une étude sur la possibilité de fixer ces deux protéines sur un même minicercle.

Matériel et méthodes

Matériel utilisé. Les oligodésoxyribonucléotides (ODN) utilisés ont été synthétisés par la méthode phosphoramidite et fournis par Eurogentec (Belgique). Les bactéries BL21 DE3 plys et le SyBrGreen ont été achetés chez Invitrogen. L'inhibiteur de protéase utilisé lors de la purification des protéines recombinantes avec une étiquette d'histidines, le polyacrylamide 19:1 acrylamide/bisacrylamide (w/w) et le phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) ont été achetés chez Sigma Aldrich. La colonne nickel agarose permettant la purification des protéines a été achetée auprès de Qiagen. Le réactif de Bradford, l'albumine de sérum bovin (SAB), le polyacrylamide 29:1 acrylamide/bisacrylamide (w/w) ont été fournis par Biorad. Les bactéries Artic ont été achetées auprès d'Agilent Technologies. L'isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) a été obtenu auprès de Qiagen. Les colonnes d'ultrafiltration Amicons Ultra 30K ont été achetées auprès de Millipore.

Production de NF-κB p50 tronquée (NF-κB-t). Le vecteur pSAN109 contenant le gène codant pour la sous unité p50 tronquée de NF-κB Histag humaine (Figure 3) a été gracieusement donné par le Pr. Blackburn (Afrique du Sud). Des bactéries BL21 DE3 plys sont transformées par ce plasmide et cultivées en présence de 100 µg/mL d'ampicilline. Les bactéries transformées sont mises en culture à 37°C jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,5 à 600 nm. La culture est induite pendant 4h avec de l'IPTG à une concentration finale de 0,1 mM. Après centrifugation, les cellules sont suspendues dans un tampon A (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol, 10 % glycérol) supplémenté avec 30 mM imidazole, un inhibiteur de protéases (Sigma) et 100 mM de PMSF avant d'être soniquées. Toutes les étapes de purification sont réalisées à 4°C. Le lysat obtenu après centrifugation est déposé sur une colonne nickel agarose et NF-κB-t est élué avec un tampon A supplémenté avec 100 mM imidazole à un débit de 1 mL/min. NF-κB-t est ensuite concentré sur un Amicon Ultra-4 30K et stocké à -70°C dans un tampon contenant 10 mM Tris HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 3 mM DTT, 0,2 mM EDTA et 10 % glycérol. La concentration de la protéine est déterminée en utilisant le réactif de Bradford en utilisant et la SAB comme référence. La concentration finale de la protéine est de 1 mg/mL. La pureté est déterminée comme étant supérieure à 95% en utilisant une coloration au bleu de Coomassie sur gel SDS PAGE 10 % acrylamide.

Production de Ets1Δ280. (Réalisée d'après Lamber EP et coll[266]) Le vecteur pET-M11 contenant le gène codant pour Ets1Δ280 Histag a été gracieusement fourni par M. Wilmanns (Allemagne). Ets1 est tronquée (Figure 3) afin de diminuer la formation de corps d'inclusion lors de sa production. De plus, les acides aminés Cys350 et Cys416 sont remplacés par des sérines pour empêcher la formation de ponts disulfure. Des bactéries Artic sont transformées avec ce plasmide avec 30 µg/mL de kanamycine. Les bactéries transformées sont mises en pré-culture durant une nuit dans un milieu LB avec 30 µg/mL de kanamycine (résistance du plasmide) et 20 µg/mL de gentamycine (résistance des bactéries). La préculture de nuit est ensuite lancée à 30°C dans un milieu LB Broth avec 30 µg/mL de kanamycine sans gentamycine jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,4 à 600 nm puis laissée à 13°C pendant 15 min pour que les bactéries se stabilisent à la température d'induction. La culture est induite pendant 16h à 13°C avec de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Après centrifugation, les cellules sont suspendues dans un tampon A contenant (30 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 2,5 % glycérol) supplémenté avec 20 mM imidazole, un inhibiteur de protéases et 100 mM de PMSF avant d'être soniquées. Toutes les étapes de purification sont réalisées à 4°C. Le lysat obtenu après centrifugation est déposé sur une colonne nickel agarose et la protéine Ets1Δ280 est éluée dans un tampon A supplémenté avec 500 mM imidazole à un débit de 1 mL/min. Ets1Δ280 est dialysée pendant une nuit dans un tampon contenant 20 mM Tris HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl et 20% glycérol. Une partie de la protéine a précipité lors de la dialyse du fait du changement de tampon. La concentration de la protéine est déterminée en utilisant le réactif de Bradford et la SAB comme référence. La concentration finale de la protéine est de 0,191 mg/mL. La pureté est déterminée comme étant supérieure à 95% en utilisant une coloration au bleu de Coomassie sur gel SDS PAGE 13 % acrylamide.

Interaction entre les minicercles et les protéines NF-κB p50/p50 tronquée et Ets1Δ280. L'interaction des ODN et des minicercles avec les protéines NF-κB p50/p50 tronquée (NF-κB-t) et Ets1Δ280 est étudiée par gel retard. Les protéines sont incubées avec l'ADN (10 ng) pendant 30 min à 4°C dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 mM EDTA, 1mM DTT, 10% glycérol, 80 mM NaCl. La réaction est déposée sur un gel 5% polyacrylamide (29:1 acrylamide/bisacrylamide (w/w); 22,5 mM Tris borate, 0,25 mM EDTA, pH 8,3) et l'électrophorèse est menée pendant 1h à 4°C. La coloration de l'ADN est réalisée en incubant le gel pendant 20 min dans du SYBR Green. Les gels sont ensuite

déposés sur un phosphoroimageur Typhoon pour une analyse de la fluorescence. La fraction liée (intensité du complexe lié/intensité totale) est déterminée en utilisant le logiciel ImageQuant 5.1.

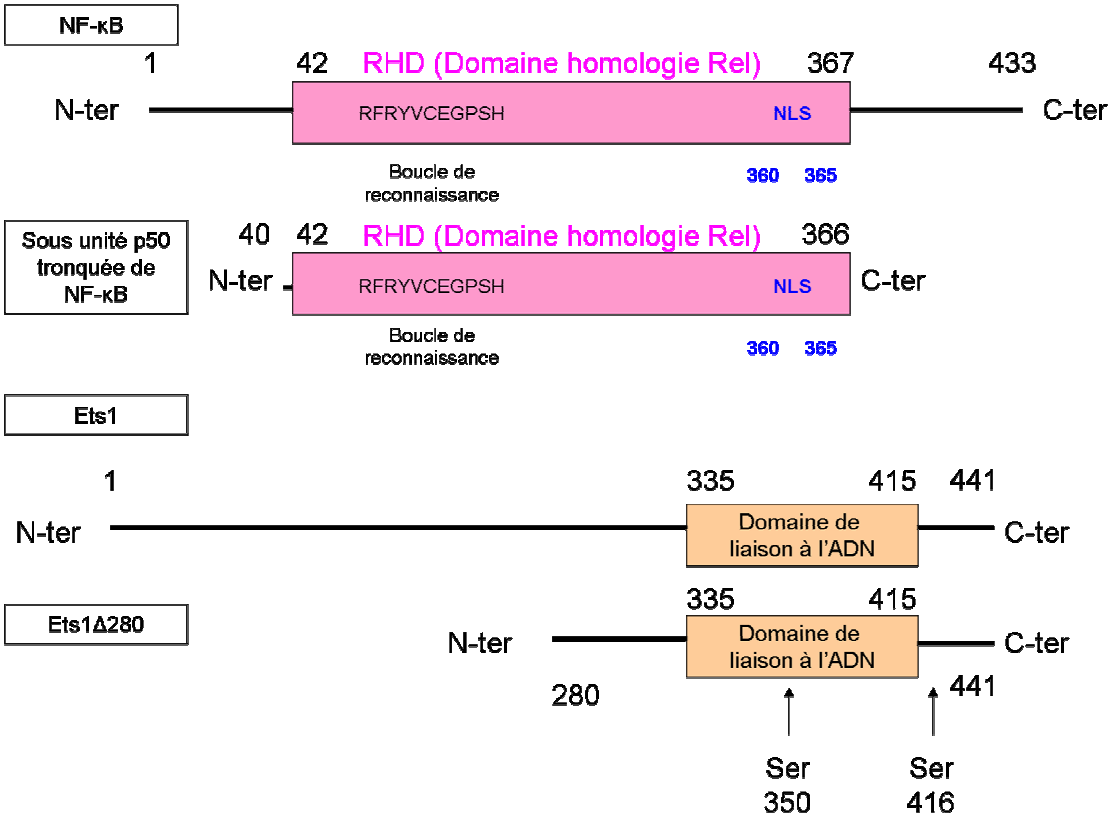
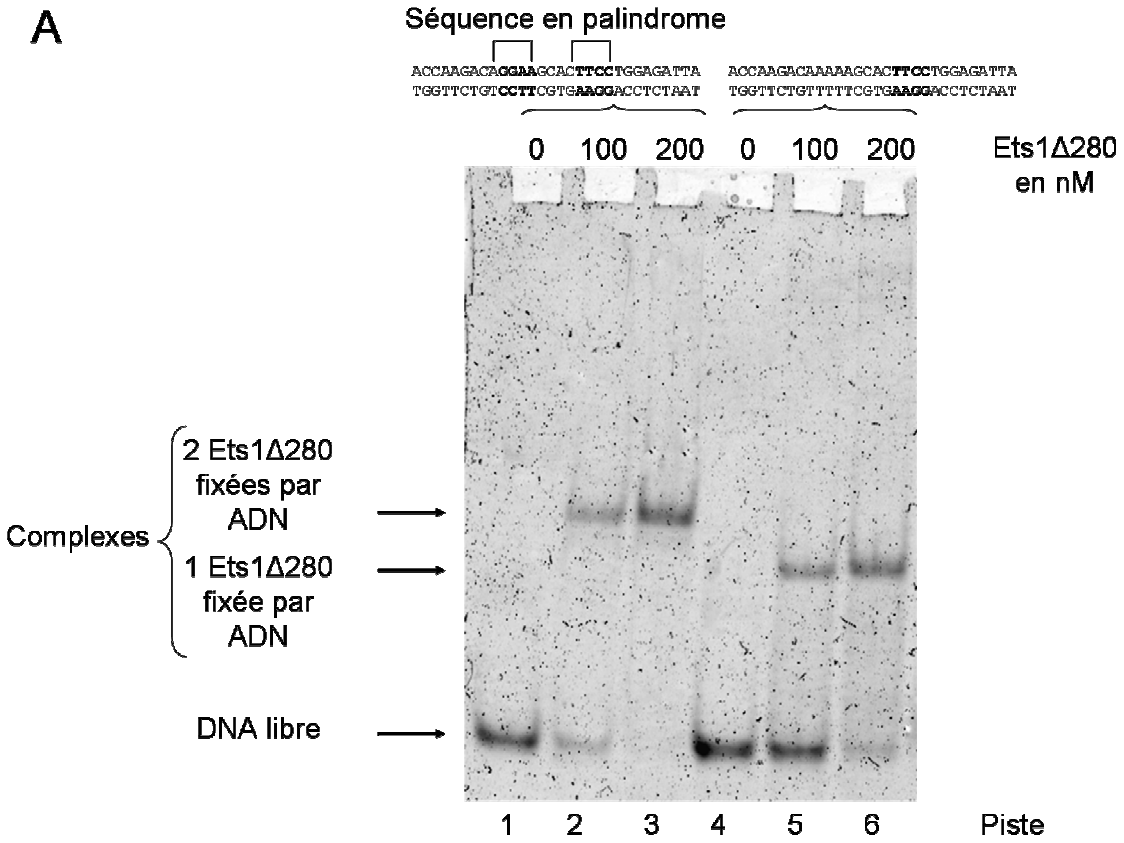


Figure 3.
Représentation des protéines purifiées. En haut, représentation de la troncature de la sous unité p50 de NF-κB. En bas, troncature et modifications de la protéine Ets1.

A/ Interaction ADN-Ets1Δ280

Afin de vérifier le mécanisme d'interaction de la protéine Ets1Δ280 avec l'ADN (mécanisme d'auto inhibition), un ODN en duplexe de 30 pb, contenant soit une séquence d'interaction, soit deux séquences d'interaction palindromique avec la protéine Ets1Δ280 est mis en présence d'une quantité croissante de cette protéine (Figure 4). Lorsque le duplexe contient une seule séquence d'interaction et est mélangé avec 100 nM d'Ets1Δ280, 30 % de l'ADN est retardé, tandis qu'avec 200 nM d'Ets1Δ280, 80 % de l'ADN est retardé. Lorsque le duplexe contient 2 séquences d'interaction, on observe un retard de migration plus important. On observe également qu'avec 100 nM d'Ets1Δ280, 60 % de l'ADN est retardé et avec 200 nM d'Ets1Δ280, 100 % de l'ADN est retardé. Ces valeurs sont en adéquation avec la

littérature puisqu'il a été montré que l'interaction d'Ets1 avec des duplexes contenant les mêmes séquences d'interaction est obtenue avec des K_D du même ordre de grandeur[263]. Ainsi, pour la même quantité d'Ets1Δ280, la quantité totale d'ADN retardé est plus importante lorsqu'il y a 2 séquences d'interaction. Donc cette protéine montre bien un mécanisme d'auto-inhibition conforme à la littérature ; pour favoriser la liaison d'Ets1Δ280 à l'ADN, il est nécessaire que la séquence d'ADN contienne 2 séquences d'interaction de Ets1Δ280 sous forme palindromique. La fixation des deux protéines se traduit donc par l'apparition d'une seule bande sur un gel retard.



B

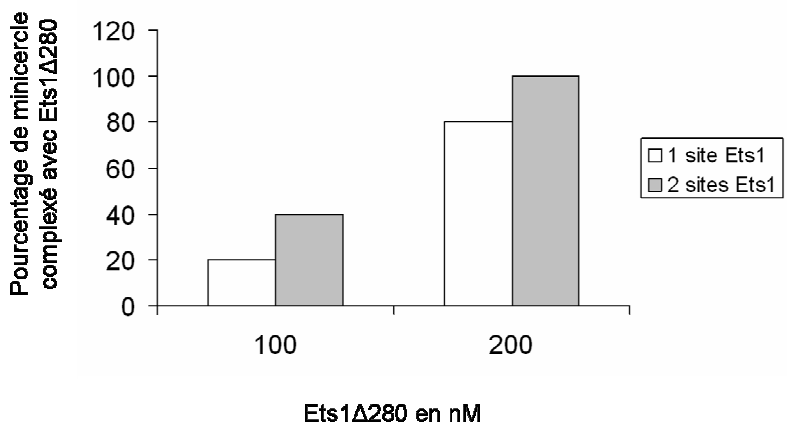


Figure 4
A. Gel retard montrant la fixation de la protéine Ets1Δ280 sur des duplexes contenant une ou deux séquences d'interaction de Ets1Δ280. Des duplexes contenant 1 site de fixation de Ets1 (Pistes 4 à 6) ou 2 sites de fixation palindromique (Pistes 1 à 3) ont été incubés avec des quantités croissantes de la protéine Ets1Δ280 puis le mélange a été déposé sur un gel de retardement électrophorétique. Les pistes 1 et 4 correspondent à l'ADN libre. Lorsque les duplexes comportent 2 séquences d'interaction avec 2 Ets1Δ280, une seule apparaît (Pistes 2 et 3) mais celle-ci est plus retardée que la bande qui correspond à l'interaction avec 1 Ets1Δ280 (Pistes 5 et 6).
B. Hitogramme représentant le pourcentage d'ADN complexé avec Ets1Δ280 en fonction de la quantité de Ets1Δ280. En blanc, le duplexe utilisé contient 1 séquence de fixation à Ets1. En gris, le duplexe utilisé contient 2 séquences de fixation à Ets1 palindromique.

B/ Interaction minicercle-Ets1Δ280

Un minicercle de 95 pb contenant 2 séquences d'interaction de Ets1 disposées comme dans le promoteur de la stromélysine-1, a été mis en présence d'une quantité croissante d'Ets1Δ280 (Figure 5A). Avec 50 nM d'Ets1Δ280, 50 % du minicercle est retardé. A 100 nM d'Ets1Δ280, 80 % du minicercle est retardé. A 200 nM d'Ets1Δ280, tout le minicercle est retardé. Une seule bande retardée est observée. Le K_D est d'environ 50 nM, ce qui est 2 fois plus faible que ce qui a été observé précédemment et dans la littérature en ce qui concerne la fixation d'Ets1 à un ADN linéaire de 30 pb contenant la séquence de la stromélysine[263] (déterminé à 94 nM). Ceci suggère qu'un minicercle favorise la liaison d'Ets1 sur l'ADN par rapport à un duplexe linéaire d'ADN. Il a été montré que la courbure de l'ADN contribue à diminuer l'effet d'auto-inhibition de Ets1[267], suggérant que la courbure induite dans un minicercle peut être reliée à une plus forte affinité de Ets1 pour un minicercle.

Un minicercle de 95 pb contenant une seule séquence de fixation à Ets1 a été incubé avec la protéine Ets1Δ280 dans les mêmes conditions (Figure 5B). Aucun retard du

minicercle n'est induit par Ets1Δ280 indiquant qu'Ets1Δ280 reconnaît spécifiquement les séquences palindromiques de fixation à Ets1 dans un minicercle.

Nos résultats suggèrent fortement que le mécanisme d'auto-inhibition de Ets1Δ280 est supprimé par la séquence palindromique contenue un minicercle permettant ainsi une fixation de 2 protéines Ets1 par minicercle.

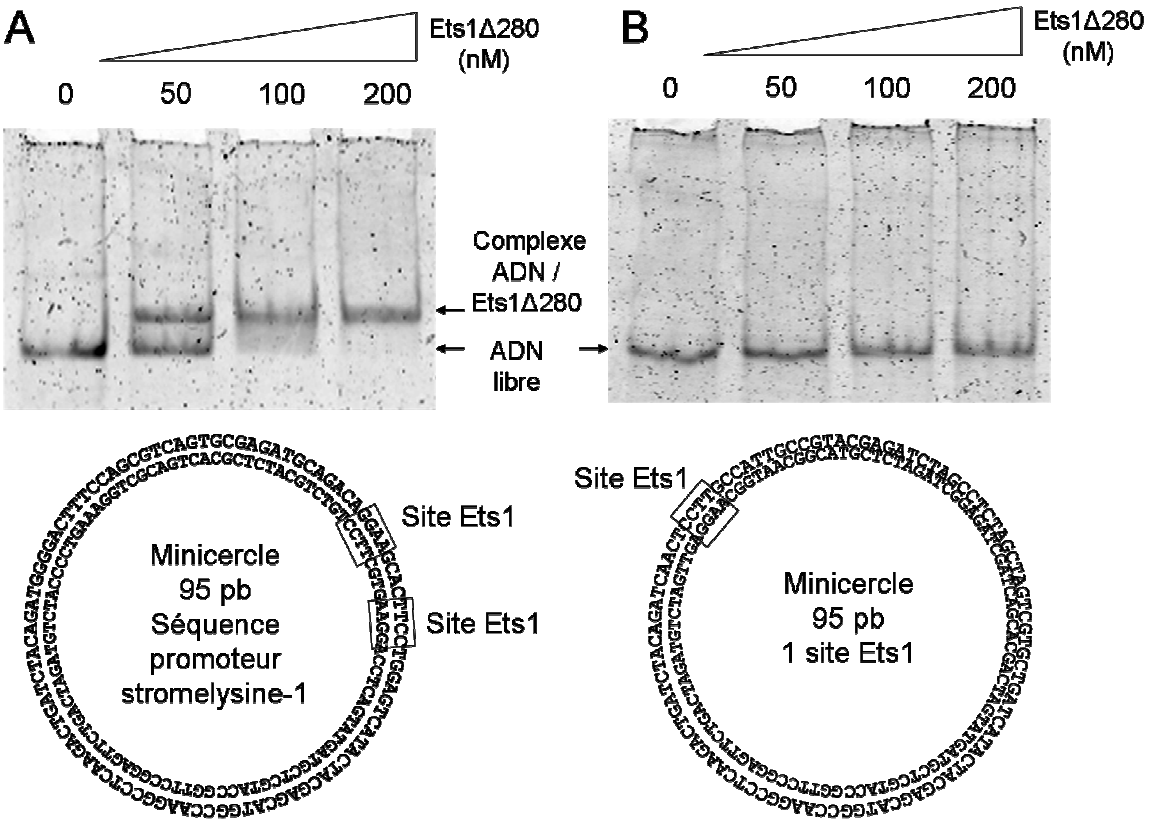


Figure 5
Gel retard montrant la fixation de la protéine Ets1Δ280 sur un minicercle de 95 pb contenant 2 sites palindromiques de liaison à Ets1.
A. Un minicercle contenant 2 sites de reconnaissance de Ets1 a été incubé avec des quantités croissantes de la protéine Ets1Δ280 comme indiqué puis le mélange analysé sur un gel de retardement électrophorétique.
B. Mêmes conditions expérimentales qu'en A mais le minicercle utilisé ne possède qu'un seul site de fixation de Ets1.

C/ Interaction du minicercle de 95 pb avec Ets1Δ280 et NF-κB

Un minicercle de 95 pb contenant 2 sites palindromique d'interaction de Ets1 et 1 site d'interaction de NF-κB a été incubé avec des quantités croissantes d'Ets1Δ280, de NF-κB-t ou d'Ets1Δ280 et NF-κB-t (Figure 6). Lorsque l'incubation a lieu avec seulement NF-κB-t (pistes 2 et 3), une seule bande retardée apparaît. La piste 2 montre qu'avec 20 nM de NF-κB-t, 50 % de l'ADN de départ est retardé. L'intensité de la bande retardée augmente avec la quantité de NF-κB. Lorsque l'incubation a lieu avec seulement Ets1Δ280 (pistes 4 et 5), une seule bande retardée apparaît correspondant à la fixation de 2 Ets1Δ280. L'intensité de la bande retardée augmente avec la quantité d'Ets1Δ280. Lorsque l'incubation est réalisée à une concentration de protéine (Ets1Δ280 ou NF-κB) conduisant à 50% de minicercle retardé pour chaque protéine, la présence simultanée des deux protéines avec le minicercle donne deux bandes retardées migrant à la même position que le complexe Ets1Δ280/minicercle et NF-κB/minicercle (piste 6). Donc si l'on incube le minicercle de 95 pb avec les 2 protéines à une concentration proche du K_D, on n'observe pas l'apparition d'une nouvelle bande correspondant à la fixation d'un minicercle avec les 3 protéines. L'apparition d'une nouvelle bande D (fixation de 1 NF-κB-t et de 2 Ets1Δ280 par minicercle) est obtenue en augmentant la concentration d'Ets1Δ280 par 2 à 4 fois (pistes 7 et 8) avec des sites positionnés comme indiqués dans la Figure 6B. Ainsi, la fixation de NF-κB-t et d'Ets1Δ280 est difficilement réalisable sur un minicercle de 95 pb. Ceci suggère qu'il y a un début d'encombrement stérique dû à la taille réduite du minicercle.

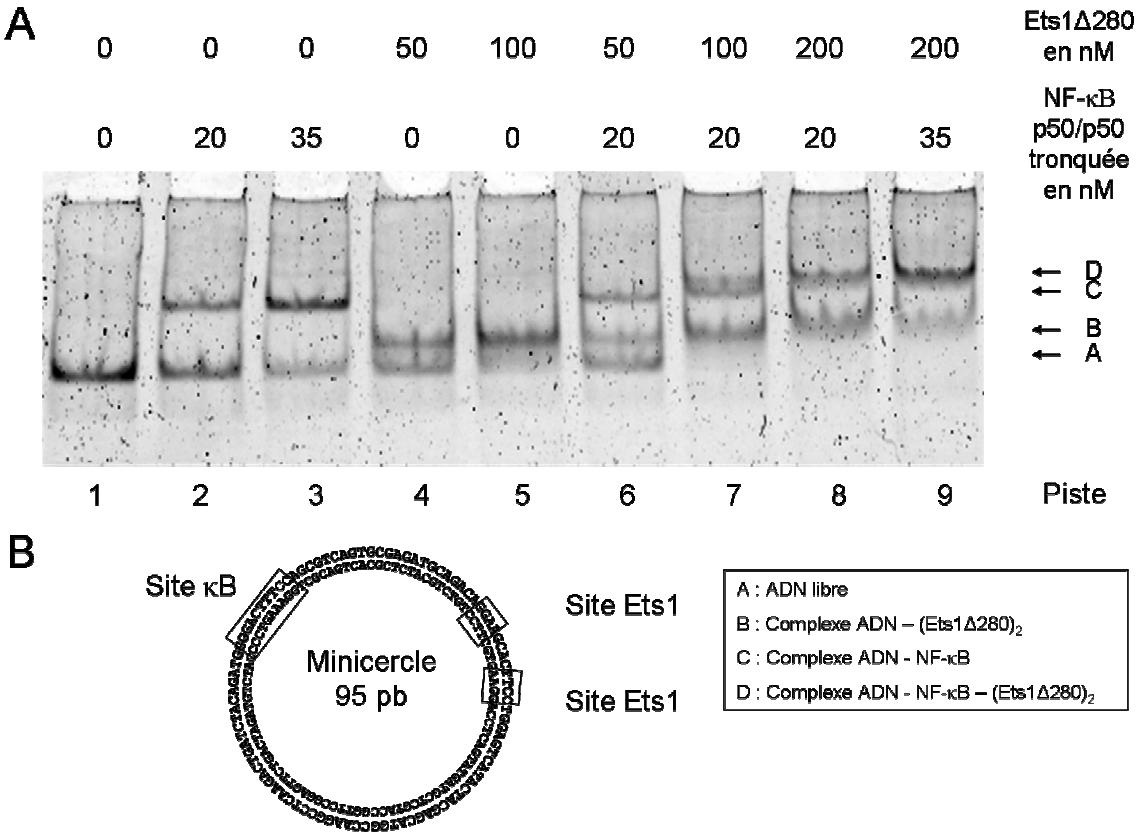


Figure 6
A/ Gel retard montrant l'interaction entre un minicercle de 95 pb et les protéines NF-κB-t et Ets1Δ280. Un minicercle comportant une séquence d'interaction de NF-κB et 2 séquences d'interaction de Ets1 a été incubé avec les protéines NF-κB-t et Ets1Δ280 selon les indications situées au dessus de chaque piste puis a été déposé sur un gel de retardement électrophorétique. La piste 1 montre une seule bande qui correspond à l'ADN libre. Sur les pistes 2 et 3, seule NF-κB-t a été ajoutée. Sur les pistes 4 et 5, seule Ets1Δ280 a été ajoutée. Sur les pistes 6 à 9, les 2 protéines ont été incubées avec le minicercle.
B/ Minicercle d'ADN de 95 pb contenant le site Ig-κB et le promoteur de le stromélysine contenant 2 sites de reconnaissance de Ets1 positionnés en palindrome.

D/ Interaction d'un minicercle de 132 pb avec Ets1Δ280 et NF-κB

Un minicercle de 132 pb contenant 2 sites palindromiques de reconnaissance d'Ets1Δ280 et 2 Ig-κB a été incubé avec des quantités croissantes de NF-κB-t $(p50)_2$, de Ets1Δ280 ou de NF-κB-t $(p50)_2$ et Ets1Δ280 (Figure 7). Lorsque l'incubation a lieu uniquement avec NF-κB-t (Piste 2), 2 bandes retardées apparaissent d'intensité décroissante, la bande la plus retardée ayant une intensité très faible. 50% du minicercle de départ est retardé en présence de 50 nM de NF-κB-t (Piste 2). Lorsque l'incubation a lieu avec 50 nM d'Ets1Δ280 (Piste 3), une seule bande retardée avec une intensité correspondant à 50% de minicercle retardé apparaît suggérant la fixation de 2 Ets1Δ280. L'intensité de la bande retardée augmente avec la quantité d'Ets1Δ280 dans la réaction (Piste 4). Lorsque

l'incubation se fait simultanément avec NF-κB-t et Ets1Δ280 à une concentration de demi saturation pour chaque protéine, 2 nouvelles bandes apparaissent (piste 5). L'une correspond au retard induit par 1 NF-κB-t et Ets1Δ280 et l'autre correspond au retard induit par 2 NF-κB-t et Ets1Δ280. Lorsque l'on augmente encore la quantité d'Ets1Δ280 (piste 6), on n'observe plus d'ADN libre et le retard induit par NF-κB-t et Ets1Δ280 devient plus important. Ces résultats montrent que 4 facteurs de transcription (2 NF-κB et 2 Ets1) interagissent simultanément avec un même minicercle permettant d'envisager une approche de multiciblage.

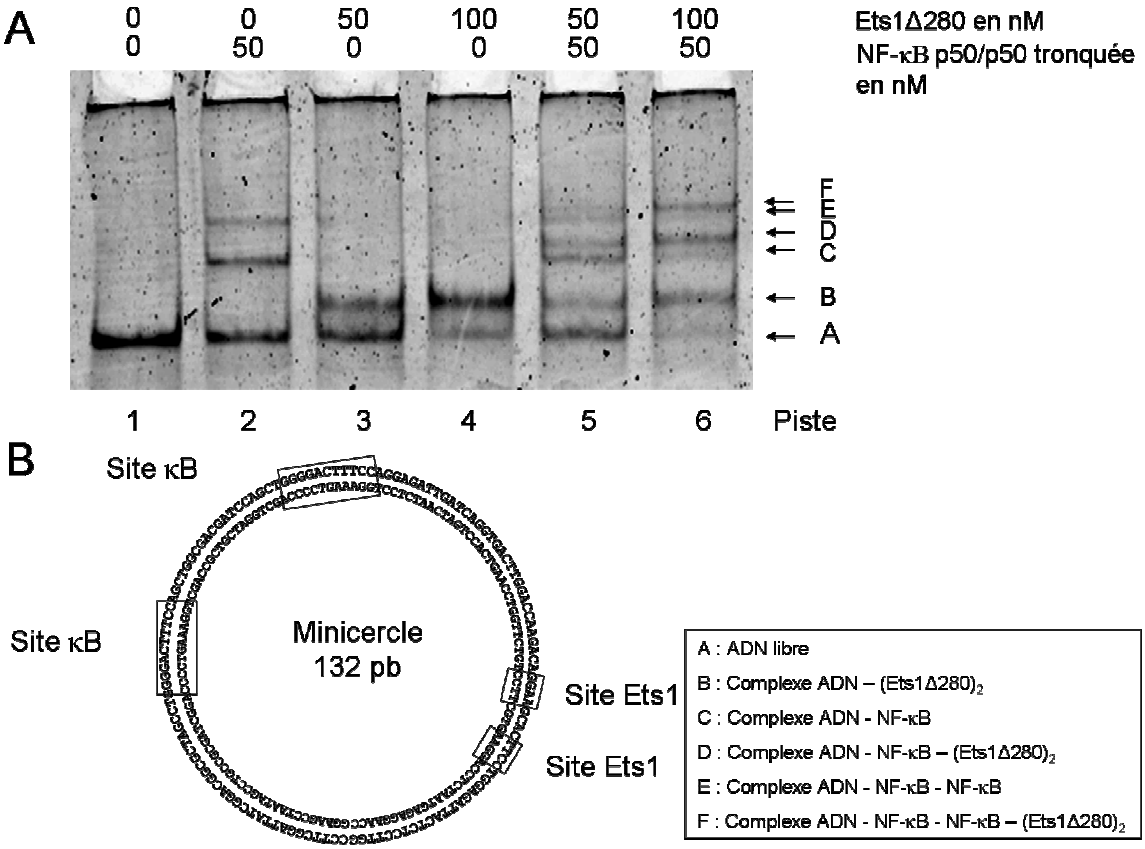


Figure 7
A/ Gel retard montrant l'interaction entre un minicercle de 132 pb et les protéines NF-κB-t et Ets1Δ280. Un minicercle comportant 2 séquences de reconnaissance de NF-κB et 2 séquences d'interaction avec Ets1 a été incubé avec les protéines NF-κB-t et Ets1Δ280 selon les indications situées au dessus de chaque piste puis a été déposé sur un gel de retardement électrophorétique. Piste 1, minicercle sans protéine. Piste 2, minicercle incubé avec NF-κB-t. Pistes 3 et 4, minicercle incubé avec Ets1Δ280. Pistes 5 et 6, minicercle incubé avec les 2 protéines.
B/ Minicercle d'ADN de 132 pb contenant 2 sites Ig-κB et le promoteur de le stromélysine contenant 2 sites de reconnaissance de Ets1 positionnés en palindrome

Discussion

Notre technique de production de minicercles permet d'introduire des séquences de reconnaissance de facteurs de transcription dont la position et le nombre sont modulables. Plusieurs séquences de reconnaissance de NF-κB et Ets1 ont été insérées dans un minicercle et l'interaction avec ces protéines a été étudiée par gel retard. Sur le cercle de 95 pb, 1 NF-κB-t et Ets1Δ280 se fixent simultanément sur le minicercle mais uniquement à des concentrations supérieures au $K_{D,}$ ceci suggérant un encombrement stérique et/ou un effet de la déformation de la structure du minicercle. Sur le cercle de 132 pb, 2 NF-κB-t et 2 Ets1Δ280 se sont fixées simultanément sur le minicercle, et ce, à des concentrations correspondant au K_D de chaque protéine, suggérant ainsi que l'augmentation de la taille d'un minicercle permet d'éviter les encombrements stériques permettant la fixation d'un plus grand nombre de protéines simultanément. Ainsi, il est possible d'affirmer que les minicercles synthétisés avec des séquences de liaison à des facteurs de transcription peuvent être utilisés comme « plateforme à leurres moléculaires ». Notons également que si l'on mute les séquences d'ADN reconnues par les facteurs de transcription, il n'y a plus de retard observé (Voir Chapitre Résultats, 3ème Partie pour la spécificité de NF-κB), ce qui montre la spécificité des interactions étudiées ici. Ceci montre également que la circularisation n'entraîne pas de liaison non spécifique. L'étude menée ici a été réalisée avec des protéines tronquées et il serait nécessaire de poursuivre cette étude avec des protéines entières.

Pour conclure, l'utilisation d'un minicercle d'ADN pour une application leurre moléculaire multicible est envisageable puisque cette étude montre qu'*in vitro* l'interaction d'un minicercle avec plusieurs facteurs de transcription différents est possible. La preuve de concept de multiciblage avec un minicercle par une stratégie leurre moléculaire doit être faite au niveau cellulaire.

Affinités différentielles de la protéine NF-κB pour l'ADN modifié par la molécule antitumorale cisplatine et son isomère transplatine inactif

Article 2 soumis pour publication

Affinités différentielles de la protéine NF-κB pour l'ADN modifié par la molécule antitumorale cisplatine et son isomère transplatine inactif.

Kasparkova, Jana; Thibault, Thomas; Kostrhunova, Hana; Vojtiskova, Marie; Midoux, Patrick; Malinge, Jean-Marc; Brabec, Viktor

L'activation continue du facteur de transcription NF-κB est corrélée au développement de tumeurs et joue un rôle important dans la résistance à de nombreux agents anticancéreux comme le cisplatine[268]. Certaines études ont également montré que le traitement de cellules cancéreuses par le cisplatine diminue la transcription NF-κB dépendante de gènes de survie[269]. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette inactivation de NF-κB.

Parmi ces hypothèses, une qui n'a pas été étudiée à ce jour est que les sites de reconnaissance de NF-κB localisés dans les promoteurs des gènes régulés par NF-κB seraient modifiés par le cisplatine, ce qui inhibe la liaison de NF-κB et donc la transcription. Cette hypothèse est d'autant plus probable que le site consensus pour la liaison de NF-κB (GGGACTTTCC) contient le site préférentiel de liaison pour le cisplatine (GG)

Dans cette étude, des duplexes d'ODN possédant la séquence de reconnaissance de NF-κB ont été platinés à différents taux avec le cisplatine ou le transplatine et l'étude de l'interaction entre la protéine NF-κB et les duplexes platinés a été étudiée *in vitro* par gel retard. Les résultats montrent que la platination du site κB par le cisplatine inhibe l'interaction entre NF-κB et l'ADN alors que pour le même niveau de modification, le transplatine n'a pas d'effet. Afin de déterminer la modulation de l'interaction NF-κB/ADN *in cellulo* par ces deux dérivés du platine, nous utilisons un leurre moléculaire de type « dumbell » contenant un site κB modifié *in vitro* par le cisplatine. Dans cette approche, la perte d'effet du leurre moléculaire est corrélée à l'inhibition de l'interaction ADN/NF-κB induite par les lésions du cisplatine.

Different Affinity of NF-κB Proteins to DNA Modified by Antitumor Cisplatin and Its Clinically Ineffective *trans* Isomer

Kasparkova, Jana; Thibault, Thomas; Kostrhunova, Hana; Vojtiskova, Marie; Midoux, Patrick; Malinge, Jean-Marc; Brabec, Viktor

Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

Introduction

Nuclear factor κB (NF-κB) is a family of transcription factors that have an essential regulatory function in inflammation, the immune response, cell proliferation, and programmed cell death (for reviews, see (1-4)). The best known subunits of mammalian NF-κB consist of Rel family molecules, including p65 (RelA), p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2), cRel and RelB, which associate in almost any combination forming various heterodimetric and homodimeric combinations (5). In the classical NF-κB signaling pathway, the p65 and p50 subunits heterodimerize and are sequestered in an inactive complex in the cytoplasm bound to the inhibitory protein I-κBα (6-8). Stress signals induce activation of IκB kinase, which phosphorylates the N-terminal signal response domain of NF-κB bound I-κBα, leading to subsequent ubiquitination and degradation by the proteasome (9). NF-κB then enters the nucleus, binds specific sequences in DNA, based on NF-κB–responsive genes, called a "κB sites" (10), and regulates transcription of its numerous target genes (11). Most physiological κB DNA sites are 10 bp in length and exhibit the consensus sequence 5'-GGGRNWYYCC-3', where R, N, W, and Y denote purine, any nucleotide, A or T, and pyrimidine bases, respectively (12,13). The κB DNA consensus sequence is degenerated and hundreds of variations exist in gene promoters.

DNA-bound NF-κB has been detected at hundreds of genes (14). Thousands of such sites are present in the DNA (15,16). It should be pointed out that selective recruitment of NF-κB to certain promoters in cells involves DNA-binding complexes containing additional non-Rel

subunit (17). Each of the Rel subunits of NF-κB harbors an amino-terminal sequence of roughly 300 amino acids, termed the Rel homology domain, that mediates dimerization, DNA-binding, nuclear localization, and cytoplasmic retention by I-κBs (18,19). In contrast, the transcription activation domain necessary for the target gene expression is present only in the carboxyl terminus of p65, c-Rel, and RelB subunits (20).

Substantial evidence indicates that NF-κB regulates oncogenesis and tumor progression. One of the important functions of NF-κB is its ability to inhibit programmed cell death via antiapoptotic or antinecrotic properties of these transcription factors (21,22). For instance, NF-κB acts to confer resistance to tumor cell death by activating the expression of antiapoptotic genes, which results either from persistent activation of NF-κB in tumors owing to constitutive I-κB kinase activity or overexpression and nuclear accumulation of the Rel proteins (see ref. (22) and refs. therein).

The cytotoxicity of a number of chemotherapeutic agents is attributed to apoptosis and/or necrosis (23). Antitumor drugs simultaneously activate several different pathways that positively and negatively regulate the cell-death process, indicating that the balance between death and survival signals could determine the efficacy of existing anticancer agents. It seems that inhibition of NF-κB activation by antitumor agents can shift the death–survival balance towards apoptosis or necrosis. Hence, inhibition of NF-κB function in tumor cells may lead to enhanced apoptosis or necrosis in response to treatment with antitumor chemotherapeutics, which may be an option responsible for efficacy of some conventional anticancer therapies. This thesis is supported by the observations demonstrating that several NF-κB inhibitors enhance the cytotoxic effect of anticancer agents (see refs. (23-25) and references therein).

One of the antitumor drugs whose antitumor efficacy was augmented in tumor cells by NF-κB inhibitors is cisplatin (*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)) (26-33). It is generally accepted that the major mechanism of action of cisplatin is that it coordinatively binds to DNA, forming DNA adducts which distort DNA conformation (34,35). This activates various signal-transduction pathways such as those involved in DNA-damage recognition and repair, cell-cycle arrest, and programmed cell death (apoptosis or necrosis) (35-37). The observations demonstrating that several DNA independent NF-κB inhibitors sensitize some ? tumor cells to cisplatin have been explained by the capability of such inhibitors to suppress NF-κB activation (ref ?). However, some NF-κB inhibitors (for instance cisplatin, doxorubicin, distamycin) are effective DNA binders.

NF-κB-mediated gene activation is crucially related to its DNA binding activity. Hence, it is reasonable to assume that NF-κB inhibitors capable of binding to the κB sites could

significantly perturb the interactions between NF-κB proteins and the κB sites. This option seems to be particularly applicable for mechanism underlying antitumor effects of cisplatin since this metallodrugs preferentially binds to guanine rich regions in DNA and each κB site conserves the consecutive three guanines in one strand and two adjacent guanines in the complementary strand (12,13).

The binding of NF-κB proteins to κB sites coordinatively modified by antitumor platinum drugs has not yet been investigated. To provide this information (to fill this gap in knowledge), in the present study we investigate the binding properties of NF-κB reconstituted from purified p50 and p65 proteins and the native complex of NF-κB from nuclear extract to DNA damaged by cisplatin or its clinically inefficient *trans* isomer. NF-κB binding to cisplatin- or transplatin-modified oligodeoxyribonucleotide duplex which contained central consensus sequence 5'-GGGACTTTCC/5'-GGAAAGTCCC was examined in cell-free media and in cells, and the relative affinity of NF-κB proteins for platinated versus unplatinated duplex was studied. These studies could provide insight into the relative cytotoxicities of these two isomers, thereby potentially aiding in the rational design of new platinum drugs as well as illuminating aspects of the role of NF-κB in chemotherapy by platinum compounds, thus also providing a basis for their repurposing.

Materials and methods

Chemicals

Cisplatin, transplatin and Bay11-7085 were obtained from Sigma (Prague, Czech Republic). The stock solutions of platinum compounds were prepared at a concentration of 5 x 10^{-4} M in $NaClO_4$ (10 mM) and stored at 4°C in the dark. Recombinant p50 protein was a kind gift from Prof. M. Vasak, University of Zurich; recombinant p65 protein, HeLa whole-cell extract (IL-1α stimulated) and antibodies against the p50 and p65 subunits of NF-κB were from Active Motif (Rixensart, Belgium). Expression and purification of domain A (residues 1–84) of the HMGB1 protein (HMGB1a) (HMG = high-mobility group) were carried out as described (38). T4 polynucleotide kinase was purchased from New England Biolabs (Beverly, MA). T4 DNA ligase and exonuclease III were from Fermentas (Burlington, Canada) and TNFα from Miltenyi Biotec (Cologne, Germany). Lipofectamine 2000 was purchased from Invitrogen (Carlsbad, USA); Acrylamide, bis(acrylamide) and dithiothreitol (DTT) were from Merck

(Darmstadt, Germany). Radioactive γ-^{32}P ATP was from Amersham (Arlington Heights, IL). Poly(dI-dC).poly(dI-dC) was from Biochemicals, Inc. (Milwaukee, USA).

Oligonucleotide probes

The synthetic oligodeoxyribonucleotides (ODNs) (Figure1B) were purchased from IDT, Inc. (Coralville, IA), and purified by using HPLC as described previously (39). The top strands of the oligonucleotides were radioactively labeled at the 5'-end with polynucleotide kinase and γ-^{32}P ATP (7000 Ci mmole^{-1}). The labeled probe was separated from unincorporated γ-^{32}P ATP using Sephadex G-50 fine columns, heated (100 °C for 3 min) and immediately ice-cooled. The radiolabeled strands were combined with equal molar amount of the corresponding bottom strands in a solution containing Tris.HCl (50 mM, pH 7.0), $MgCl_2$ (10 mM), and DTT (1 mM). The strands were annealed by heating to 65 °C for 10 min, followed by cooling to 4 °C for 4 h. The duplex formation was subsequently checked by loading onto 15% native polyacrylamide (PAA) gels. In the present work, the molar concentrations of the single-stranded ODNs or ODN duplexes are related to the oligomers (not to the monomer content) or double-stranded molecules, respectively. Molar extinction coefficients for the single-stranded ODNs were determined by phosphate analysis (40).

Platination reactions

ODN duplexes were incubated with platinum compounds (cisplatin or transplatin) in $NaClO_4$ (10 mM) at 37 °C for 24 h in the dark; the molar ratio of the ODN duplex:Pt-complex was 1, 2 or 4. After incubation, the ODN duplexes were precipitated by ethanol in order to remove unbound platinum. The levels of modification (average number of the molecules of the platinum compound coordinatively bound per duplex) were determined by flameless atomic absorption spectrophotometry (FAAS). FAAS measurements were carried out on a Varian (Palo Alto, CA) AA240Z Zeeman atomic absorption spectrometer equipped with a GTA 120 graphite tube atomizer.

Gel mobility shift assay

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed as described previously (41,42). Briefly, the binding reactions were performed in 20 µL volume containing Tris.HCl (10 mM, pH 7.5), NaCl (50 mM), DTT (1 mM), EDTA (1 mM), bovine serum albumin (BSA) (10 mgmL^{-1}), NP-40 (1%), glycerol (5%), poly(dI-dC).poly(dI-dC) (4.1 x 10^{-5} M

related to the phosphorus content), radiolabeled ODN duplex (unplatinated or modified by cisplatin or transplatin, 0.02 pmol), purified proteins p50/p50 (0.2 pmol), p65/p65 (0.3 pmol), heterodimer p50/p65 (0.3 pmol) or interleukin-1 alpha (IL-1α) stimulated HeLa whole-cell extract (1µL, ~2 µg of proteins). The p50/p65 heterodimer was formed by incubating equal amounts of p50 and p65 at 37 °C for 60 min (final protein concentration was 0.2 pmolµL^{-1}). After incubation at 20 °C for 45 min, the reaction mixtures were loaded onto 6% native PAA gels prepared with 0.5xTris-borate-EDTA (prerun for 1 h at 300 V and 4 °C). The gels were run at 300 V and 4 °C for 1.5 h after a prerun for 1 h. The gels were dried and exposed to a molecular imaging plate. The images were recorded by using a FUJIFILM bioimaging analyzer. The relative amounts of DNA-protein complex and total DNA were obtained by integrating the volumes of their respective band (ODN-protein complex) or bands (total ODN) by using the AIDA image analyzer software.

The percentage of DNA bound to protein was calculated according to the following equation:

ODN duplex bound (%) = [protein-ODN duplex complex/total ODN duplex] x 100% = [protein-ODN complex:(free ODN + protein-ODN complex)] x 100%.

EMSAs in the presence of HMGB1a and p50/p50 homodimer were performed as described above, with the following modification. The binding reactions were performed in HEPES (10 mM, pH = 7.5), $MgCl_2$ (10 mM), LiCl (50 mM), NaCl (100 mM), spermidin (1 mM), BSA (0.2 mgmL^{-1}), Nonidet P40 (0.05%).

Radiolabeled ODN duplex (unmodified or modified by cisplatin 1:1) (0.02 pmol) was preincubated with HMGB1a (0.3 pmol) on ice for 60 min, then p50/p50 homodimer was added (0.1 pmol) and incubated for 5 min at 20 °C. The reaction mixtures were resolved on 6% native PAA gels prepared with 0.5xTris-borate-EDTA (prerun for 1 h at 300 V and 4 °C). Alternatively, proteins p50/p50 homodimer and HMGB1a were added to the reaction simultaneously and incubated on ice for 60 min or p50 homodimer was added first to the reaction, preincubated for 5 min at 20 °C and after subsequent addition of HMGB1a, the mixture was further incubated on ice for 1h. The reaction mixtures were resolved on 6% native PAA gels prepared with 0.5xTris-borate-EDTA (prerun for 1 h at 300 V and 4 °C).

Preparation and platination of dumbbell ODNs

The following 5’ phosphorylated single-stranded ODNs **ACTTTCC**CAGGTTTTCCTGGGAAAGTCCCCTCAACTTTTGTTGAG**GGG** and TGATCTAGCCTTTTGGCTAGATCAGGTACGAAGCTTTTGCTTCGTACC from

Eurogentec were used for formation of decoy and scrambled dumbbell ODN, respectively (the bold letters indicate κB site) (Figure 1C). Dumbbell ODN formation was carried out by incubating ODN at a concentration of 40 μM in ligase buffer with 10 μL of T4 DNA ligase (Fermentas) at 20 °C for 2 h. Then, ligase was heat inactivated and exonuclease III was added to digest unligated ODN. The dumbbell ODN was then recovered after ethanol precipitation and resuspended in 10 mM $NaClO_4$. Decoy dumbbell ODN (2 μM) was incubated with cisplatin or transplatin in 10 mM $NaClO_4$ overnight at 37 °C at molar ratios as indicated in the text.

Gel retardation and lipoplex formation

Lipoplexes were prepared by mixing 0.1 μg of dumbbell decoy or scrambled ODN with 0.33 μL of Lipofectamine 2000 corresponding to a ratio ODN:lipid ($\mu g \mu L^{-1}$) of 0.3. These complexes were allowed to equilibrate for 30 min at room temperature before adding loading buffer and analysis by gel electrophoresis. Electrophoresis was conducted on 5% PAA gel [acrylamide:bisacrylamide 19:1, Tris borate (90 mM), EDTA (1 mM, pH 8.3] for 30 min at 13 Vcm^{-1}. The gel was stained with Gel Red (Interchim, San Pedro, USA) and digitally photographed using Gene Flash Image Station (Syngene, Cambridge, UK).

Cell culture

Stable human NF-κB-RE-*luc2P* HEK293 cell line was from Promega (Madison, USA). Cells were grown at 37 °C with 5 % CO_2 in DMEM supplemented with fetal bovine serum (10 %), hygromycin B (50 μgmL^{-1}), 100 IU penicillin and streptomycin (100 μgmL^{-1}) (PAA Laboratories, Pasching, Austria).

In vitro transfection of ODN

One day before transfection, stable HEK293-NF-κB-luciferase reporter cells were seeded onto 96-wells plate. When the cells reached 30-40 % confluence, they were transfected in triplicate with the platinated or unplatinated dumbbell ODN using Lipofectamine 2000 as transfection agent [ODN (μg) to Lipofectamine 2000 ratio (μL) was 0.3] in 100 μL of Opti-MEM with fetal bovine serum. After 4 h at 37 °C in a humidified 5% CO_2 incubator, 100 μL of DMEM with fetal bovine serum (18 %) with or without human TNFα (50 $ngmL^{-1}$) was added. After 24 h, cell viability was quantitated using Alamar Blue assay (Invitrogen) and luciferase expression was analyzed after cell lysis.

Luciferase activity

The luciferase gene expression was measured by monitoring the luminescence activity of cells lysate. Firefly luciferase gene expression was measured using luciferin as described previously (43). The luminescence was recorded for 10 s with a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold). All measurements were performed in triplicate. Calibration between relative cells proliferation measurement (Alamar Blue assay) and protein quantitation (Bio-Rad BCA assay) allowed to express the luciferase activity as relative number of light units (RLU) per relative cells proliferation measurement (arbitrary units).

Results

Binding of p65, p50 homodimers and p50/p65 heterodimer to platinated DNA containing the consensus response element (κB site)

These studies were performed using a short (22 bp) ODN duplex, κB ODN (Figure 1B), which contained central consensus sequence 5'-GGGACTTTCC/5'-GGAAAGTCCC of the immunoglobulin κ light chain gene enhancer (Ig-κB) which is a part of numerous important NF-κB–responsive genes (12). The duplex was globally modified by cisplatin or transplatin so that the duplex contained on the average 1, 2, or 4 molecules of the platinum complex coordinatively bound to the duplex. The unplatinated synthetic double-helical poly(dI-dC).poly(dI-dC) was added as the nonspecific competitor. These mixtures were incubated with either p65/p65 or p50/p50 homodimers or p50/p65 heterodimer at NF-κB protein to duplex molar ratio of 10 and analyzed using native PAA gel electrophoresis (PAGE) (Figure 2). NF-κB to duplex molar ratio of 10 was chosen which afforded ~85% binding of the labeled duplex probe to the protein. It has to be emphasized that the experiments described in this article, in which purified platinated κB ODN probes were used, were performed in the absence of any free platinum complex in the incubation mixtures. Hence, the effects observed could not be affected by the binding of free molecules of the platinum complex to the proteins.

Incubation of the unplatinated κB ODN with NF-κB resulted in the appearance of a new, more slowly migrating species, with a concomitant decrease of the intensity of the band corresponding to the free 22-bp duplex (Figure 2, left panels, lanes 1). This result confirmed the formation of the complex between κB ODN and NF-κB.

In contrast, the incubation of κB ODN modified by cisplatin so that on the average 1, 2, or 4 molecules of this metallodrug were coordinatively bound to the duplex with either p65/p65 or p50/p50 homodimers or p50/p65 heterodimer reduced the yield of the species migrating more slowly in the gel. For instance, the modification of κB ODN by 4 molecules of cisplatin on the average inhibited formation of the complex between this duplex and p65/p65, p50/p50 or p50/p65 by 76, 86 or 53%, respectively (shown in Figure 2, left panels, lanes 5 and in right panels in Figure 2).

κB ODN was also globally modified by transplatin and incubated with p65/p65, p50/p50 or p50/p65. A very small reduction of the intensity of the band corresponding to the complex formed between NF-κB proteins and κB ODN (by 9-16%) was noticed even at so high level of the platination of the duplex as that corresponding to 4 molecules of transplatin bound to the duplex on the average - i.e. under conditions when cisplatin adducts inhibited formation of the complex between NF-κB and the duplex markedly (Figure 2). Thus, these experiments confirmed that transplatin adducts affect the binding affinity of the κB site to NF-κB proteins only very weakly.

To determine the relative affinities of purified p50/p50 and p65/p65 homodimers for the different platinated κB ODNs, competition experiments using an EMSA were perfomed as well. The details of these experiments are described in the Supplementary information. These results revealed that p50/p50 and p65/p65 homodimers recognized κB site in the κB ODN duplex modified by cisplatin with a 6.5- or 6.7-fold lower affinity, respectively, compared to the unmodified κB ODN duplex. In contrast, modification κB ODN duplex by transplatin reduced binding affinity of p50/p50 and p65/p65 homodimers only by 1.3- and 1.7-fold respectively.

Binding of native complex of NF-κB from whole cell extract to platinated DNA containing the κB site

The native complex of NF-κB from nuclear extracts consists of both Rel and non-Rel subunits that actually comprise multiple protein complexes with different gene activation specificities (17,19). Thus, it was also of interest to investigate binding of native NF-κB in whole cell extract to platinated DNA containing or lacking the Ig-κB site. We employed in these experiments EMSAs with whole cell extracts prepared from HeLa cells stimulated with the cytokine interleukin-1 alpha (IL-1α) that causes activation of NF-κB signal transduction pathway and κB ODN non-modified or modified by cisplatin or transplatin was used as a

probe. Incubation of the unplatinated κB ODN with the whole cell extract stimulated by IL-1α resulted in the appearance of the new, more slowly migrating species, with a concomitant decrease of the intensity of the band corresponding to the 22-bp duplex (Figure 3, lane 2). This result confirmed the formation of the complex between κB ODN and native complex of NF-κB. The specificity of these bands was confirmed by cold ODN duplex competition: κB ODN competed away induced bands (not shown). Moreover, the addition of antibodies against the p50 and p65 subunits of NF-κB indicated that the upper two more slowly migrating bands contained p65/p65 homodimer and p50/p65 heterodimer consistent with previous reports (17,44) (not shown).

The incubation of κB ODN modified by cisplatin so that on the average 1, 2, or 4 molecules of this metallodrug were bound to the duplex with the whole cell extract stimulated by IL-1α reduced the yield of the species migrating more slowly in the gel and corresponding to p65/p65 homodimer, p50/p65 heterodimer and other NF-κB proteins. For instance, the modification of κB ODN by 4 molecules of cisplatin on the average inhibited formation of the complex between this duplex and native NF-κB proteins by 62% (Figure 3A, lane 8 and Figure 3B). κB ODN was also globally modified by transplatin and incubated with the whole cell extract stimulated by IL-1α. A very small reduction of the intensity of the bands corresponding to the complexes formed between native NF-κB proteins and κB ODN (by only 3%) was noticed even at so high level of the platination of the duplex as that corresponding to 4 molecules of transplatin bound to the duplex on the average (Figure 3A, lane 5 and Figure 3B), i.e. under conditions when cisplatin adducts inhibited formation of the complex between native NF-κB and the duplex markedly (Figure 3, lane 8 and Figure 3B). Thus, these experiments confirmed that transplatin adducts affect the binding affinity of native NF-κB proteins to the κB site only very weakly.

Binding of NF-κB to platinated DNA lacking the κB site

We also investigated binding of NF-κB to the 22 bp duplex lacking the κB site (scrambled ODN, for its sequence see Figure 1B), but modified by cisplatin or transplatin under identical experimental conditions as described in the preceding paragraphs. Incubation of the unplatinated duplex (scrambled ODN) with p65/p65, p50/p50, p50/p65 or with whole cell extracts prepared from HeLa cells stimulated with the IL-1α resulted in no changes in the migration of the duplex lacking the κB site, demonstrating that complex between NF-κB proteins and DNA lacking κB site was not formed (shown in Figures 4A,B lane 2 for p65/p65 homodimer and cell extract, respectively). The same results were obtained with the duplex

lacking the κB site globally modified by cisplatin or transplatin so that the duplex ODN scrambled contained on the average 4 molecules of the platinum complex bound to the duplex. No more slowly migrating species as a consequence of the modification by cisplatin or transplatin was noticed (Figures 4A,B lanes 3,4). Thus, these results indicate that DNA adducts of cisplatin or transplatin do not represent a structural motif recognizable by NF-κB proteins.

HMG-domain proteins specifically inhibit the binding of p50/p50 homodimer to cisplatin-modified DNA containing the κB site

Several studies suggest that HMG-domain proteins can play a role in mediating the cytotoxicity of cisplatin (37,45). It has been demonstrated in this connection that high mobility group (HMG)-domain motifs bind specifically to the major cisplatin-DNA adducts, 1,2-GG or AG intrastrand cross-links, which comprise ~90% of the lesions formed by this metallodrug on DNA (46). Previous studies have shown that HMG-domain proteins sensitize cells to cisplatin by shielding its DNA adducts from nucleotide excision repair (37,47). Therefore, the ability of HMG-domain proteins to influence the binding of NF-κB to its DNA response element (κB site) modified by cisplatin was investigated next.

κB ODN modified by cisplatin pre-incubated with HMG-domain protein was incubated with p50/p50 homodimer to investigate directly the effects of HMG-domain proteins on binding of NF-κB to cisplatin-modified DNA containing the κB site. In these experiments we used domain A of HMGB1 protein (HMGB1a) which is the dominating domain in full-length HMGB1 protein that binds to the 1,2-intrastrand cross-links of cisplatin (48)) and EMSA to analyze binding of the proteins to κB ODN.

First we verified that HMGB1a does not bind to non-modified κB ODN under conditions when p50/p50 readily forms the complex with κB ODN. Whereas incubation of the unplatinated κB ODN with p50/p50 resulted in the appearance of the new, more slowly migrating species [with a concomitant decrease of the intensity of the band corresponding to the 22-bp duplex incubated in the absence of p50/p50], no such a more slowly migrating species was observed when unplatinated κB ODN was incubated with HMGB1a (cf. lanes 2 and 3 in Figure 5). Interestingly, if unplatinated κB ODN was first pre-incubated with HMGB1a and subsequently p50/p50 homodimer was added, the intensity of the band corresponding to the more slowly migrating species was higher than that corresponding to the complex between unplatinated κB ODN and p50/p50 in the absence of HMGB1a (cf. lanes 3 and 4 in Figure 5). This result suggests that HMGB1 proteins exhibit the stimulatory effect on

the binding of NF-κB proteins to their DNA consensus response elements (κB sites) and in this way may enhance the activity of NF-κB as a transcription factor.

Experiments identical to those described in the preceding paragraph were also performed with κB ODN modified by cisplatin so that on the average 1 molecule of this metallodrug were coordinatively bound to the duplex (Figure 5, lanes 5-8). As shown in Figure 5, lane 6 HMGB1 modification of κB ODN by cisplatin resulted in the binding of HMGB1a protein to this DNA probe. In contrast, in accord with the results described above, the modification of κB ODN by cisplatin decreased affinity of p50/p50 to this duplex (cf. lanes 3 and 7 in Figure 5). Furthermore, if κB ODN modified by cisplatin was first pre-incubated with HMGB1a and only subsequently p50/p50 homodimer was added, formation of the complex between this platinated duplex and p50/p50 was inhibited considerably more than in the absence of HMGB1a (cf. lanes 7 and 8 in Figure 5). Qualitatively identical results were obtained if HMGB1a and p50/p50 were added to the platinated κB ODN simultaneously or if the platinated κB ODN was pre-incubated with p50/p50 and only subsequently HMGB1a was added. However, formation of the complex between the platinated duplex and p50/p50 was inhibited somewhat less than when the platinated probe was first pre-incubated with HMGB1 (not shown). In aggregate, these results reveal that HMGB1a protein strengthen inhibiting effect of DNA adducts formed by cisplatin in κB site in terms of the binding of NF-κB proteins to their κB DNA motif.

Binding study of NF-κB to platinated κB DNA site in cells

Intracellular delivery of ODN containing a consensus DNA sequence of transcription factors has been used previously in a decoy approach which consists in the inhibition of transcription factor binding to promoter region of targeted genes, resulting in the inhibition of gene expression (49). Especially, ODNs containing a κB binding sequence have been employed successfully to target cellular NF-κB and in turn to inhibit NF-κB-dependent transcriptional activity (50). In this part of our study, we sought to exploit the decoy strategy to study the effect of platination of κB site on DNA binding activity of NF-κB active in cells.

For that purpose, we employed a decoy ODN with a dumbbell shaped structure comprised of two short circular thymine loops and a stem containing the κB site (Figure 1C). The dumbbell decoy ODN has a natural phosphodiester backbone with improved resistance to cellular nucleases due to a structure devoid of free ends (51). Thus, it was possible to modify the decoy ODN by cisplatin or transplatin in the same manner as that used above for modification

of the linear κB ODN. Using EMSA, we verified using EMSA that the effects of DNA adducts of cisplatin and transplatin formed in κB sites of linear and decoy (dumbbell shaped) ODNs on the binding of p65/p65 and p50/p50 homodimers or p50/p65 heterodimer to these platinated κB sites were identical (not shown).

Lipid-based transfection protocol using the well-known reagent Lipofectamine 2000 was previously used for delivery of dumbbell decoy ODNs within cells through the formation of lipoplex (51,52). *In vitro* complexation between Lipofectamine 2000 and the decoy ODN either unplatinated or platinated (ODN to Lipofectamine 2000 ratio (μL) was 0.3) was examined by EMSA (Figure 6). As shown in lane 1 of Figure 6, unplatinated dumbbell ODN migrates as a single band in the absence of Lipofectamine 2000; addition of the lipid resulted in the appearance of a new, more slowly migrating species, with a concomitant disappearance of the band corresponding to the free decoy ODN (Figure 6, lane 2). This result confirmed the formation of a lipoplex as expected. The same pattern of complexation was observed with the dumbbell ODN either platinated by cisplatin or transplatin so that on the average 1 or 4 molecules of the platinum complex were coordinatively bound to the ODN (shown in Figure 6, lanes 4 and 6 for 4 molecules of the platinum complex bound to the ODN). This result revealed that platination of the dumbbell ODN had no effect on lipoplex formation under experimental conditions used. Thus, the cellular uptake of both unplatinated and platinated decoys could take place under appropriate conditions for the purpose of comparing their effect on NF-κB-mediated transcription.

Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cell line containing a stably integrated luciferase-reporter gene driven by a NF-κB-responsive promoter with multiple κB elements was used to study the effect of platination on the decoy activity of the NF-κB dumbbell ODN. As shown in Figure 7A, the basal level of luciferase induction as measured by the intensity of the luminescence, indicates that NF-κB transcriptional activity is low in this reporter cell line and treatment of cells with the cytokine tumor necrosis factor α (TNFα), a well-known NF-κB activity inducer, induced a strong luminescence increase as expected (25). The responsiveness of the promoter to NF-κB dependent down regulation was also confirmed by the results of experiments in which cells were treated in the presence of the NF-κB pathway inhibitor Bay 11-7085. When cells were transfected with the unplatinated decoy ODN, an almost 50 % decrease of the luminescence was observed whereas there was no inhibition when the cells were transfected with scrambled dumbbell ODN lacking the κB site. These results showed that the transcriptional activity of NF-κB in HEK293 cells was specifically inhibited by the dumbbell NF-κB decoy ODN. Further the cells were transfected with the decoy ODN

modified by cisplatin or transplatin so that on the average 1 or 4 molecules of the metallodrug were coordinatively bound to the decoy ODN. As shown in Figure 7B, when transfection was performed with cisplatin-modified decoy ODN so that on the average only 1 molecule of the metallodrug was coordinatively bound to the decoy ODN, the luciferase signal was decreased by about 50% which compares to the decrease observed with the unplatinated dumbbell decoy ODN. In contrast, if the platination was increased (4 molecules of the metallodrug bound to the decoy ODN on the average), the decoy activity of the modified ODN was strongly inhibited as deduced from the high level of luciferase activity which is close to that observed with the scrambled ODN. These data suggest that cisplatin inhibited cellular NF-κB binding to the platinated decoy ODN modified so that 4 molecules of the metallodrug were bound to the decoy ODN. If cells were transfected with decoy ODN modified by transplatin, the luciferase activity decreased by about 50% and 40 % for the level of platination corresponding to 1 or 4 molecules of the platinum complex bound to the decoy ODN, respectively. Modification of decoy ODN by transplatin had no effect on the decoy activity for the level of platination corresponding to 1 molecule of the platinum complex bound to the decoy ODN and only a weak effect for the level of platination corresponding to 4 molecules of the platinum complex bound to the decoy ODN. Thus, it can be deduced that at the level of platination corresponding to 4 molecules of the platinum complex bound to the decoy ODN, DNA adducts of cisplatin inhibit cellular NF-κB binding to κB site about 4-fold more efficiently than the adducts of transplatin. To our knowledge, this is for the first time when the decoy approach is reported in which drug-modified decoy ODN is used in order to assess the effect of a DNA binding drug on recognition activity of a transcription factor.

Discussion

DNA adducts of antitumor cisplatin reduce the binding affinity of the κB site to NF-κB proteins, whereas the adducts of clinically ineffective transplatin do not

We have characterized the effects of antitumor cisplatin and clinically ineffective transplatin on the affinity of NF-κB p50/p50 and p65/65 homodimers, p50/p65 heterodimers and the native complex of NF-κB from nuclear extract using EMSA. We observed (Figures 2-4,7) that whereas the DNA κB site-NF-κB protein interaction was significantly perturbed by DNA adducts of cisplatin, DNA adducts of transplatin were markedly less effective both in cell-free media and in the cells. In principle, cisplatin coordinatively bound to κB site could interfere

with the binding of NF-κB proteins to the consensus DNA response element by a steric effect. Simple steric effects are, however, unlikely to be of critical importance because transplatin (which has a structure and bulkiness similar to cisplatin) coordinatively bound to the κB site at the same level as cisplatin affects affinity of NF-κB proteins considerably less.

The X-ray structures of various NF-κB dimers bound to different κB sites have shown (12,13,53-56) that sequence-dependent conformational variability of κB sites plays a critical role in the sequence-specific binding of NF-κB proteins to DNA and the stability of the resulting complex. Extraordinary demands for this binding specificity and selectivity of NF-κB proteins are closely related to the conformation and flexibility of κB DNA sequences, which play a critical role in the recognition of NF-κB dimers and in dictating the final conformation of the complex (13). The κB sites including that investigated in the present work contain several sites at which bifunctional adducts of cisplatin strongly distorting DNA conformation are formed. In particular, they contained the sites at which major intrastrand cross-links between adjacent purines (at d(GG) or 5'-d(AG)) are formed. For instance, the structure of these adducts determined by NMR methods has revealed (57,58) that these adducts induce the overall helix bend of 40–78° toward the major groove, DNA unwinding of 25–27°, severe perturbation of hydrogen bonding within the 5'-coordinated GC base pair (bp), and distortion extends over at least 4–5 bp at the site of the cross-link. Thus, cisplatin can form in the κB sites bifunctional adducts which strongly disturb its secondary structure. The result of these perturbations is that the precise conformation required for the formation and stability of the complex of NF-κB proteins with the κB sites cannot be attained, so that NF-κB proteins do not bind to the κB sites.

Clinically ineffective transplatin also forms various types of adducts in DNA. It forms mainly monofunctional adducts at G residues and some amount of interstrand cross-links between complementary G and C residues (59-61). Monofunctional adducts of transplatin (and cisplatin) affect DNA conformation only slightly, without bending (62), and DNA unwinding is very small (~6°) (63). In addition, the conformational alterations induced by the interstrand cross-link of transplatin are small (64,65). The duplex is slightly distorted on both sides of the cross-link, but all bases are still paired and hydrogen-bonded. The cross-link of transplatin only unwinds the double helix by ~12° and induces a slight, flexible bending of ~20° of its axis toward the minor groove. We conclude that these relatively subtle structural perturbations induced by transplatin in the κB sites have no substantial effect on the formation of the complex of NF-κB proteins with the κB sites. In aggregate, a marked difference between DNA adducts of cisplatin and transplatin is found in their intrinsic effect on the

conformation of DNA or their propensity to distort DNA. The distinctive structural features of cross-links of cisplatin suggest a unique role for these adducts in the inhibition of the binding of NF-κB proteins to platinated DNA segments containing the κB sites.

HMG-domain proteins specifically strengthen inhibition of binding of NF-κB proteins to the κB site modified by cisplatin

The results of the present work also reveal that HMGB1a protein strengthen inhibiting effect of DNA adducts formed by cisplatin in κB site in terms of the binding of NF-κB proteins to their κB DNA motif (Figure 5). HMG-domain proteins are known to specifically bind 1,2-intrastrand cross-links of cisplatin and thus mediate antitumor effects of this drug (37,66). The details of how the binding of HMG-domain proteins to cisplatin-modified DNA sensitizes tumor cells to cisplatin are still not completely resolved, but possibilities such as shielding cisplatin-DNA adducts from excision repair or titrating away these proteins from their transcriptional regulatory function have been suggested as clues to how these proteins are involved in the antitumor activity (67). It is therefore possible that NF-κB and HMG-domain proteins encounter each other at the sites of 1,2-intrastrand adducts of cisplatin (formed in the κB site). Since HMG-domain proteins bound to DNA modified by cisplatin cover considerably more base pairs in the κB site than the plain cross-link of cisplatin, it is reasonable to expect that this interaction could further promote keeping NF-κB protein away from the κB site modified by cisplatin.

An intriguing observation was that HMG-domain proteins exhibit a slight, but significant stimulatory effect on the binding of NF-κB proteins to their non-modified DNA consensus response elements (κB sites) (Figure 5). At present we hesitate to offer an explanation of this preliminary observation. Further research focused on clarification whether HMG-domain proteins can promote the formation of specific NF-κB enhanceosomes is in progress in our laboratories and the results of this study will be published in a separate communication.

Biological implications

There is substantial evidence suggesting that NF-κB plays a central role in the cellular response to DNA damage. It is also clear that NF-κB function may only be one of many factors that modulate cisplatin sensitivity or resistance, and the effects may be different for various cell types. In addition, sequence-specific DNA binding is one of the key biochemical activities responsible for much of the biological function of NF-κB. Hence, the observation described in the present work demonstrating that cisplatin adducts formed in the κB sites

reduce its binding affinity to NF-κB proteins may affect these key biochemical activities. Because the affinity of NF-κB to the κB sites is not affected by the adducts of clinically ineffective transplatin, we suggest that the reduced affinity of the NF-κB proteins to the κB sites due to their modification by cisplatin is relevant to the biological activity of this drug.

A possible intriguing scenario for response to cellular exposure to cisplatin is that in a certain type of tumor cells cisplatin binds to the DNA κB site(s) in the cell nucleus and in this way it may inhibit binding of NF-κB proteins to its consensus response elements. The cytotoxicity of cisplatin is attributed to apoptosis and/or necrosis (23). Cisplatin simultaneously activates several different pathways that regulate the cell-death process (45). It is possible that inhibition of NF-κB antiapoptotic or antinecrotic cascades via inhibition of its binding to κB site(s) by DNA adducts of cisplatin can significantly contribute to efficiency of this metallodrug to trigger apoptosis or necrosis. In other words, inhibition of NF-κB function in tumor cells mediated by inhibition of its binding to κB site(s) by DNA adducts of cisplatin may lead to enhanced programmed cell death in response to treatment with cisplatin. Owing to the fact that thousands of κB sites are present in the DNA (15,16), it seems reasonable to suggest that mechanisms underlying antitumor efficiency of cisplatin and its analogues in some tumor cells also involve downstream processes following inhibition of the binding of NF-κB to κB site(s) by DNA adducts of cisplatin. Lastly, a technical novelty reported herein is the decoy strategy approach using platinated dumbell ODN in order to assess the *in cellulo* capability of platinum drugs to differentially modulate the DNA binding activity of NF-κB transcription factor. In the future, such technical approach is promising to screen efficient metal based drugs capable to inhibit several transcription factors binding to their consensus sequence including NF-κB and also other transcription factors such as STAT3 which are known to cooperate in inducing tumor cell growth (68).

In conclusion, addition of NF-κB to the list of protein-DNA complexes that can be disrupted by antitumor cisplatin potentially increases the utility of platinum coordination complexes as regulators of gene expression. In addition, an approach to control of downstream effects such as protein recognition and pathways of programmed cell death induction may consist in design of new, structurally unique metal-based complexes capable of forming DNA adducts as cell signals.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Science Foundation (Grant 301/09/H004) and by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant M200041201). This work was also supported by the Ligue Nationale Française contre le cancer; we acknowledge the ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche for a french grant attributed to T.T.

References

1. Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappa B puzzle. *Cell*, **109,** S81-S96.
2. Pomerantz, J.L. and Baltimore, D. (2002) Two pathways to NF-kappa B. *Mol Cell*, **10,** 693-695.
3. Ravi, R. and Bedi, A. (2004) NF-κB in cancer—a friend turned foe. *Drug Resist Updates*, **7,** 53-67.
4. Campbell, K.J. and Perkins, N.D. (2006) Regulation of NF-kappa B function. *Transcription.* Portland Press Ltd, London, England, pp. 165-180.
5. Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappa B. *Genes Dev*, **18,** 2195-2224.
6. Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Vanantwerp, D. and Miyamoto, S. (1995) Rel/NF-κ-B/I-κ-B family: Intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*, **9,** 2723-2735.
7. Baeuerle, P.A. and Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-κB in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **12,** 141-179.
8. Thanos, D. and Maniatis, T. (1995) NF-κB: A lesson in family values. *Cell*, **80,** 529-532.
9. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-κB activity. *Annu Rev Immunol*, **18,** 621-663.
10. Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-κB and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16,** 225-260.
11. Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*, **18,** 6853-6866.

12. Chen, F.E., Huang, D.B., Chen, Y.Q. and Ghosh, G. (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappa B bound to DNA. *Nature*, **391,** 410-413.

13. Huang, D.-B., Phelps, C.B., Fusco, A.J. and Ghosh, G. (2005) Crystal structure of a free κB DNA: Insights into DNA recognition by transcription factor NF-κB. *J Mol Biol*, **346,** 147-160.

14. Schreiber, J., Jenner, R.G., Murray, H.L., Gerber, G.K., Gifford, D.K. and Young, R.A. (2006) Coordinated binding of NF-κB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103,** 5899-5904.

15. Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T.E., Luscombe, N.M., Rinn, J.L., Nelson, F.K., Miller, P., Gerstein, M. *et al.* (2003) Distribution of NF-κB-binding sites across human chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100,** 12247-12252.

16. Natoli, G., Saccani, S., Bosisio, D. and Marazzi, I. (2005) Interactions of NF-κB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat Immunol*, **6,** 439-445.

17. Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D. *et al.* (2007) Ribosomal protein S3: A KH domain subunit in NF-κB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell*, **131,** 927-939.

18. Chen, L.-F. and Greene, W.C. (2004) Shaping the nuclear action of NF-κB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5,** 392-401.

19. Wan, F. and Lenardo, M.J. (2009) Specification of DNA binding activity of NF-κB proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **1**: a000067.

20. Huxford, T., Malek, S. and Ghosh, G. (1999) Structure and mechanism in NF-κB/IκB signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **64,** 533-540.

21. Luo, J.-L., Kamata, H. and Karin, M. (2005) The anti-death machinery in IKK/NF-kappa B signaling. *J Clin Immunol*, **25,** 541-550.

22. Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G. and Gelinas, C. (2006) Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappa B. *Oncogene*, **25,** 6800-6816.

23. Nakanishi, C. and Toi, M. (2005) Nuclear factor-kappa B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Rev Cancer*, **5,** 297-309.

24. Baud, V. and Karin, M. (2009) Is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, **8,** 33-40.

25. Miller, S.C., Huang, R., Sakamuru, S., Shukla, S.J., Attene-Ramos, M.S., Shinn, P., Van Leer, D., Leister, W., Austin, C.P. and Xia, M. (2010) Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-κB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol*, **79,** 1272-1280.

26. Sanchez-Perez, I., Benitah, S.A., Martinez-Gomariz, M., Lacal, J.C. and Perona, R. (2002) Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulate NF kappa B activity and cell viability. *Mol Biol Cell*, **13,** 2933-2945.

27. Mabuchi, S., Ohmichi, M., Nishio, Y., Hayasaka, T., Kimura, A., Ohta, T., Saito, M., Kawagoe, J., Takahashi, K., Yada-Hashimoto, N. *et al.* (2004) Inhibition of NF-kappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *J Biol Chem*, **279,** 23477-23485.

28. Venkatraman, M., Anto, R.J., Nair, A., Varghese, M. and Karunagaran, D. (2005) Biological and chemical inhibitors of NF-κB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol Carcinog*, **44,** 51-59.

29. Strozyk, E., Poppelmann, B., Schwarz, T. and Kulms, D. (2006) Differential effects of NF-kappa B on apoptosis induced by DNA-damaging agents: the type of DNA damage determines the final outcome. *Oncogene*, **25,** 6239-6251.

30. Dhandapani, K.M., Mahesh, V.B. and Brann, D.W. (2007) Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NF kappa B transcription factors. *J Neurochem*, **102,** 522-538.

31. Solomon, L.A., Ali, S., Banerjee, S., Munkarah, A.R., Morris, R.T. and Sarkar, F.H. (2008) Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by genistein: the role of NF-kappaB. *J Ovarian Res*, **1**.

32. Chanvorachote, P., Pongrakhananon, V., Wannachaiyasit, S., Luanpitpong, S., Rojanasakul, Y. and Nimmannit, U. (2009) Curcumin sensitizes lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through superoxide anion-mediated Bcl-2 degradation. *Cancer Invest*, **27,** 624-635.

33. Oiso, S., Ikeda, R., Nakamura, K., Takeda, Y., Akiyama, S.I. and Kariyazono, H. (2012) Involvement of NF-kappa B activation in the cisplatin resistance of human epidermoid carcinoma KCP-4 cells. *Oncol Rep*, **28,** 27-32.

34. Brabec, V. (2002) DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **71,** 1-68.

35. Kelland, L. (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Rev Cancer*, **7,** 573-584.

36. Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C. and Perez, J.M. (2003) Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem*, **10,** 257-266.

37. Jung, Y. and Lippard, S.J. (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev*, **107,** 1387-1407.

38. Stros, M. (1998) DNA bending by the chromosomal protein HMG1 and its high mobility group box domains. Effect of flanking sequences. *J Biol Chem*, **273,** 10355-10361.

39. Kasparkova, J., Farrell, N. and Brabec, V. (2000) Sequence specificity, conformation, and recognition by HMG1 protein of major DNA interstrand cross-links of antitumor dinuclear platinum complexes. *J Biol Chem*, **275,** 15789-15798.

40. Butour, J.L., Alvinerie, P., Souchard, J.P., Colson, P., Houssier, C. and Johnson, N.P. (1991) Effect of the amine nonleaving group on the structure and stability of DNA complexes with cis-$[Pt(R\text{-}NH_2)_2(NO_3)_2]$. *Eur J Biochem*, **202,** 975-980.

41. Taylor, B.S., de Vera, M.E., Ganster, R.W., Wang, Q., Shapiro, R.A., Morris, S.M., Billiar, T.R. and Geller, D.A. (1998) Multiple NF-κB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, **273,** 15148-15156.

42. Fujita, T., Nolan, G.P., Ghosh, S. and Baltimore, D. (1992) Independent modes of transcriptional activation by the p50-subunit and p65-subunit of NF-kappa-B. *Genes Dev*, **6,** 775-787.

43. De Wet, J.R., Wood, K.V., Deluca, M., Helinski, D.R. and Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **7,** 725-737.

44. Sathe, S.S., Sizemore, N., Li, X., Vithalani, K., Commane, M., Swiatkowski, S.M. and Stark, G.R. (2004) Mutant human cells with constitutive activation of NF-κB. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101,** 192-197.

45. Wang, D. and Lippard, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Rev Drug Discov*, **4,** 307-320.

46. Fichtinger-Schepman, A.M.J., Van der Veer, J.L., Den Hartog, J.H.J., Lohman, P.H.M. and Reedijk, J. (1985) Adducts of the antitumor drug cis-

diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, **24,** 707-713.

47. Huang, J.C., Zamble, D.B., Reardon, J.T., Lippard, S.J. and Sancar, A. (1994) HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91,** 10394-10398.
48. Dunham, S.U. and Lippard, S.J. (1997) DNA sequence context and protein composition modulate HMG-domain protein recognition of ciplatin-modified DNA. *Biochemistry*, **36,** 11428-11436.
49. Mann, M.J. and Dzau, V.J. (2000) Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J Clin Invest*, **106,** 1071-1075.
50. Osako, M.K., Tomita, N., Nakagami, H., Kunugiza, Y., Yoshino, M., Yuyama, K., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ogihara, T. and Morishita, R. (2007) Increase in nuclease resistance and incorporation of NF-κB decoy oligodeoxynucleotides by modification of the 3'-terminus. *J Gene Med*, **9,** 812-819.
51. Sun, X., Zhang, J., Wang, L. and Tian, Z. (2008) Growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by blocking STAT3 activation with decoy-ODN. *Cancer Lett*, **262,** 201-213.
52. Gao, H.H., Xiao, J.N., Sun, Q., Lin, H.X., Bai, Y.L., Yang, L., Yang, B.F., Wang, H.Z. and Wang, Z.G. (2006) A single decoy oligodeoxynucleotides targeting multiple oncoproteins produces strong anticancer effects. *Mol Pharmacol*, **70,** 1621-1629.
53. Muller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L. and Harrison, S.C. (1995) Structure of the NF-κB p50 homodimer bound to DNA. *Nature*, **373,** 311-317.
54. Ghosh, G., Vanduyne, G., Ghosh, S. and Sigler, P.B. (1995) Structure of NF-κB P50 homodimer bound to a κB site. *Nature*, **373,** 303-310.
55. Muller, C.W., Rey, F.A. and Harrison, S.C. (1996) Comparison of two different DNA-binding modes of the NF-kappa B p50 homodimer. *Nat Struct Biol*, **3,** 224-227.
56. Cramer, P., Larson, C.J., Verdine, G.L. and Muller, C.W. (1997) Structure of the human NF-kappa B p52 homodimer-DNA complex at 2.1 angstrom resolution. *EMBO J*, **16,** 7078-7090.
57. Yang, D.Z., van Boom, S.S.G.E., Reedijk, J., van Boom, J.H. and Wang, A.H.J. (1995) Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin-cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis. *Biochemistry*, **34,** 12912-12920.

58. Gelasco, A. and Lippard, S.J. (1998) NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) adduct d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry*, **37,** 9230-9239.

59. Leng, M., Locker, D., Giraud-Panis, M.J., Schwartz, A., Intini, F.P., Natile, G., Pisano, C., Boccarelli, A., Giordano, D. and Coluccia, M. (2000) Replacement of an NH_3 by an iminoether in transplatin makes an antitumor drug from an inactive compound. *Mol Pharmacol*, **58,** 1525-1535.

60. Leng, M., Schwartz, A. and Giraud-Panis, M.J. (2000) Transplatin-modified oligonucleotides as potential antitumor drugs. In Kelland, L. R. and Farrell, N. P. (eds.), *Platinum- Based Drugs in Cancer Therapy*. Humana Press Inc, Totowa/NJ, pp. 63-85.

61. Brabec, V., Sip, M. and Leng, M. (1993) DNA conformational distortion produced by site-specific interstrand cross-link of trans-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*, **32,** 11676-11681.

62. Brabec, V., Reedijk, J. and Leng, M. (1992) Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding. *Biochemistry*, **31,** 12397-12402.

63. Keck, M.V. and Lippard, S.J. (1992) Unwinding of supercoiled DNA by platinum ethidium and related complexes. *J Am Chem Soc*, **114,** 3386-3390.

64. Brabec, V. and Leng, M. (1993) DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90,** 5345-5349.

65. Brabec, V. (2000) Chemistry and structural biology of 1,2-interstrand adducts of cisplatin. In Kelland, L. R. and Farrell, N. P. (eds.), *Platinum-based Drugs in Cancer Therapy*. Humana Press Inc, Totowa/NJ, pp. 37-61.

66. Kartalou, M. and Essigmann, J.M. (2001) Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Res*, **478,** 1-21.

67. Zamble, D.B. and Lippard, S.J. (1999) The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA. In Lippert, B. (ed.), *Cisplatin Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. VHCA, WILEY-VCH, Zürich, Weinheim, pp. 73-110.

68. Grivennikov, S. and Karin, M. (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and cross-talk in cancer. *Cyt. Growth Factor Rev.*, **21**, 11-19.

Figure Legends

Figure 1. A. Structures of platinum complexes used in this work. B. Nucleotide sequences of the 22-bp oligodeoxyribonucleotide duplexes containing or lacking κB site. C. Nucleotide sequences of dumbbell oligodeoxyribonucleotides used in human cells transfection studies. The bold letters in the sequences of κB ODN and decoy dumbbell oligonucleotide indicate κB site.

Figure 2. Binding of NF-κB p50/p50 and p65/p65 homodimers and NF-κB p50/p65 heterodimer to the 22-bp duplex containing κB site (κB ODN) (panels A, B, C, respectively).
Left panels show autoradiograms of the EMSA experiments. Oligonucleotide duplex was either non-modified (lanes 1,2) or globally modified by cisplatin or transplatin so that on the average 1 (lanes 3,6), 2 (lanes 4,7), or 4 (lanes 5,8) molecules of the platinum complex were coordinatively bound to the duplex. A gel mobility retardation assay was performed in the presence of the unplatinated poly(dI-dC).poly(dI-dC) non-specific competitor in 6% PAA gel; concentrations of the κB ODN was 1 nM and the concentration of p50/p50, p65/p65 and p50/p65 was 10, 15 and 15 nM, respectively. The oligonucleotide duplex κB ODN was radioactively labeled at the 5‘-end of the top strand. For other details, see “Materials and Methods”.
Right panels show plots of the amount of the oligonucleotide duplex κB ODN in the complex with p50/p50 and p65/p65 homodimers and p50/p65 heterodimer on the amount of the platinum complex bound per one molecule of the duplex. Cisplatin, filled circles; transplatin, empty squares. Data are means ± SD from three different experiments.

Figure 3. Binding of native complex of NF-κB from whole cell extract to the 22-bp duplex containing κB site (κB ODN). Whole cell extract was prepared from HeLa cells stimulated with the cytokine interleukin-1 alpha. A. Autoradiogram. Oligonucleotide duplex was either non-modified (lanes 1,2) or globally modified by cisplatin or transplatin so that on the average 1 (lanes 3,6), 2 (lanes 4,7), or 4 (lanes 5,8) molecules of the platinum complex were coordinatively bound to the duplex. A gel mobility retardation assay was performed in the presence of the unplatinated poly(dI-dC).poly(dI-dC) non-specific in 6% PAA gel; concentrations of the κB ODN was 1 nM and the total concentration of the proteins in the cell

extract was 2 $mgmL^{-1}$. The oligonucleotide duplex κB ODN was radioactively labeled at the 5‘-end of the top strand. For other details, see “Materials and Methods”.
B. The plots of the amount of the oligonucleotide duplex κB ODN in the complex with native NF-κB on the amount of the platinum complex bound per one molecule of the duplex. Cisplatin, filled circles; transplatin, empty squares. Data are means ± SD from three different experiments.

Figure 4. Binding of NF-κB p50/p50 homodimer and native complex of NF-κB from whole cell extract to the 22-bp duplex lacking κB site. The figure shows autoradiograms of the EMSA experiments showing binding of p50/p50 (A) or native complex of NF-κB (B) to the duplex ODN scrambled which was either non-modified (lanes 1,2) or globally modified by cisplatin or transplatin so that 4 molecules of the platinum complex were coordinatively bound to the duplex on the average (lanes 3 and 4, respectively). A gel mobility retardation assays were performed in the presence of the unplatinated poly(dI-dC).poly(dI-dC) non-specific competitor in 6% PAA gel; concentrations of scrambled ODN was 1 nM, the concentration of p50/p50 homodimer was 15 nM and the total concentration of the proteins in the cell extract was 2 $mgmL^{-1}$. As a control experiment, binding of p50/p50 homodimer and native complex of NF-κB from whole cell extract to the 22-bp duplex containing κB site (κB ODN) was analyzed in parallel (lanes 5 and 6).

Figure 5. Effect of HMG-domain protein on binding of p50/p50 homodimer to the 22-bp duplex containing κB site (κB ODN). Autoradiograms of the EMSA experiments. Oligonucleotide duplex was either non-modified (lanes 1-4) or globally modified by cisplatin so that on the average 1 molecule of cisplatin was coordinatively bound to the duplex (lanes 5-8). Domain A of full-length HMGB1 protein (HMGB1a) was used. The oligonucleotide duplex κB ODN (1 nM) radioactively labeled at the 5‘-end of the top strand was first preincubated with HMGB1 (30 nM) on ice for 60 min. Subsequently p50/p50 homodimer (10 nM) was added and the mixture was incubated for additional 5 min at 20 °C. A gel mobility retardation assay was performed in the presence of the unplatinated poly(dI-dC).poly(dI-dC) non-specific competitor in 6% PAA gel. For other details, see “Materials and Methods”.

Figure 6. Lipoplex formation in the presence of the cationic lipid Lipofectamine 2000 and platinated or unplatinated dumbbell ODN. Image of stained polyacrylamide gel showing the electrophoretic migration of dumbbell ODN incubated with or without Lipofectamine 2000 as

indicated. The dumbbell decoy ODN was either unmodified (lanes 1,2) or globally modified by cisplatin (lanes 3,4) or transplatin (lanes 5,6) so that 4 molecules of the platinum complex were coordinatively bound to the duplex on the average.

Figure 7. Differential inhibition of the transcription activity of NF-κB by dumbbell decoy ODN unmodified or modified by cisplatin or transplatin in HEK293-NF-κB-luciferase reporter cell line. A. In the absence of transfection, TNFα increased NF-κB dependent luciferase signal by 96 times whereas Bay 11-7085 decreases TNFα-dependent luciferase signal of cells; a near specific 50 % decrease of the luminescence is observed when cells are transfected with 50 nM NF-κB dumbbell decoy ODN. B. Dumbbell ODN modified by cisplatin has lost the decoy activity for the level of platination corresponding to 4 molecules of the platinum complex bound to decoy ODN on the average whereas transplatin modification doesn't induce decrease of the decoy activity. The luciferase activity measured 24 h after the cells were transfected, was normalized to 100 % of TNFα treatment of non-transfected cells. Ratios Pt/ODN of 1 and 4 correspond to the level of platination corresponding, respectively, to, on the average, 1 and 4 molecules of cisplatin or transplatin bound to decoy ODN prior transfection, respectively. Data are means ± SD obtained from triplicate wells and are representative of at least three independent experiments.

Figure 1

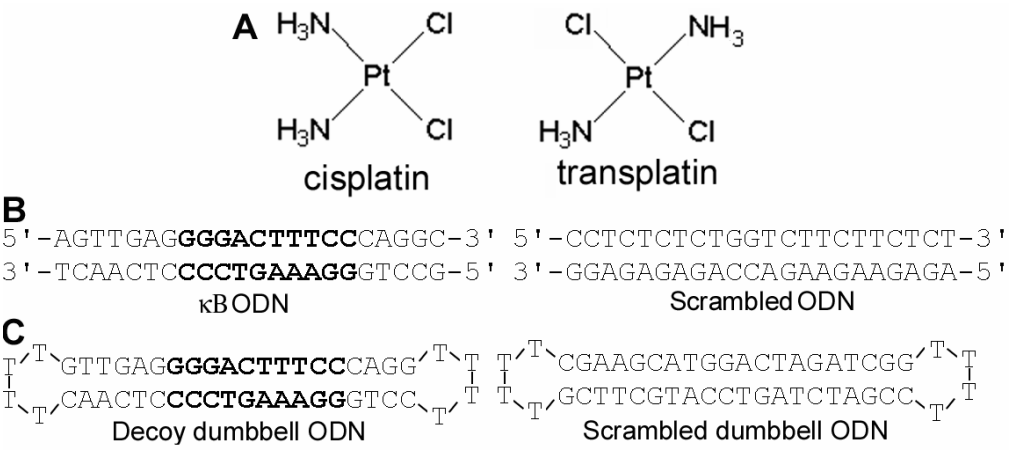

A
H3N
Cl
Pt
H3N
Cl
cisplatin
Cl
NH3
Pt
H3N
Cl
transplatin
B
5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'
κB ODN
5'-CCTCTCTCTGGTCTTCTTCTCT-3'
3'-GGAGAGAGACCAGAAGAAGAGA-5'
Scrambled ODN
C
GTTGAGGGGACTTTCCCAGG
CAACTCCCCTGAAAGGGTCC
Decoy dumbbell ODN
CGAAGCATGGACTAGATCGG
GCTTCGTACCTGATCTAGCC
Scrambled dumbbell ODN

Figure 2

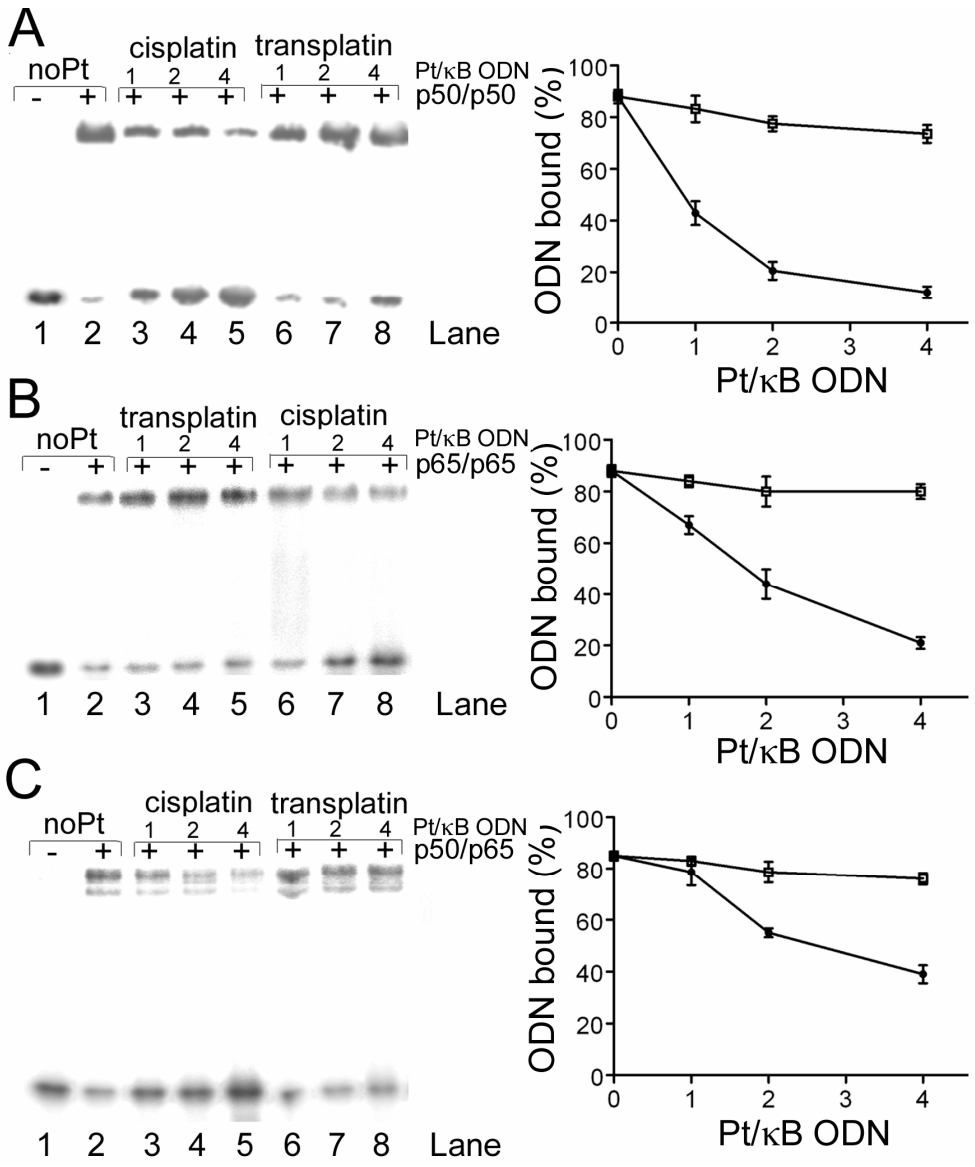

A
noPt
cisplatin
transplatin
1 2 4
1 2 4
Pt/κB ODN
p50/p50
- +
1 2 3 4 5 6 7 8 Lane
ODN bound (%)
Pt/κB ODN
B
noPt
transplatin
cisplatin
p65/p65
C
cisplatin
transplatin
p50/p65

Figure 3

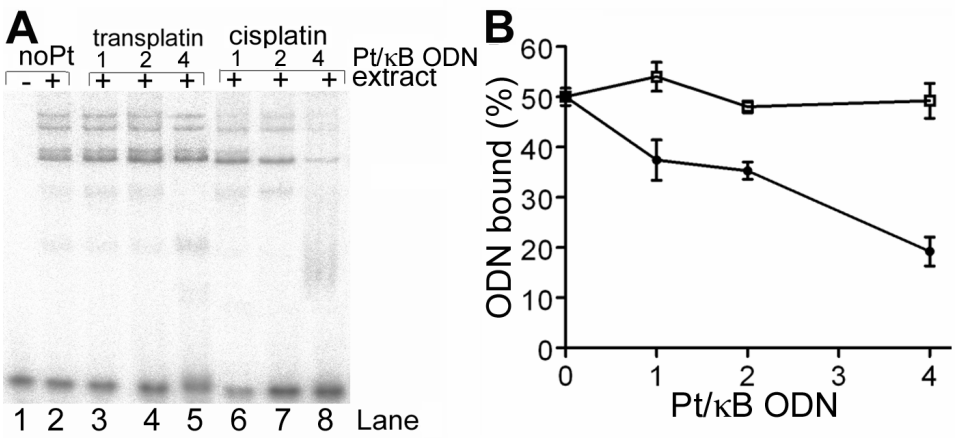


Figure 4

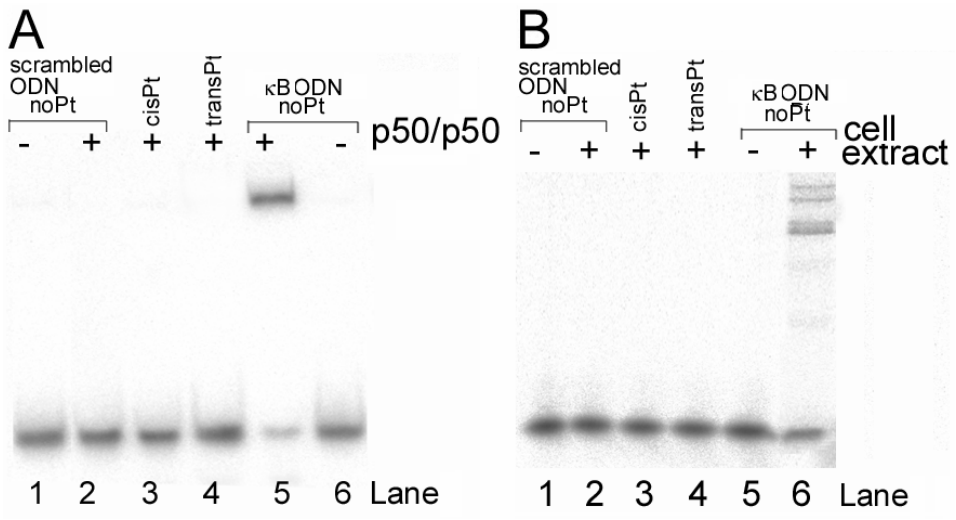


Figure 5

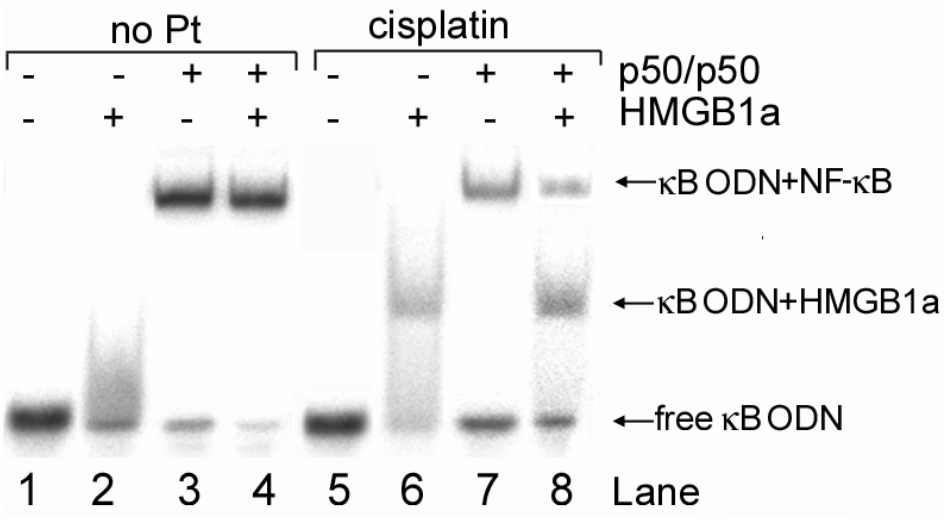


Figure 6

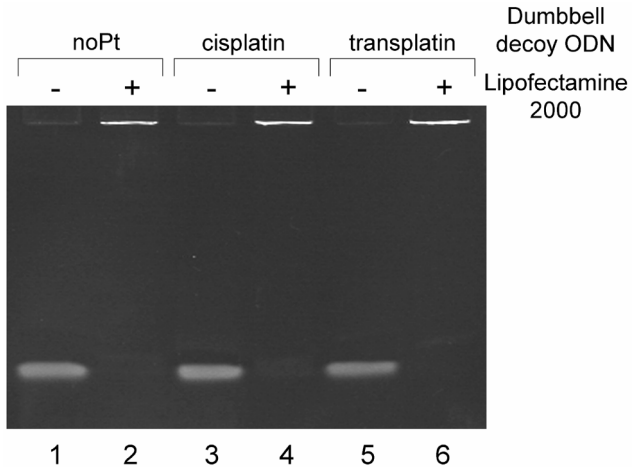
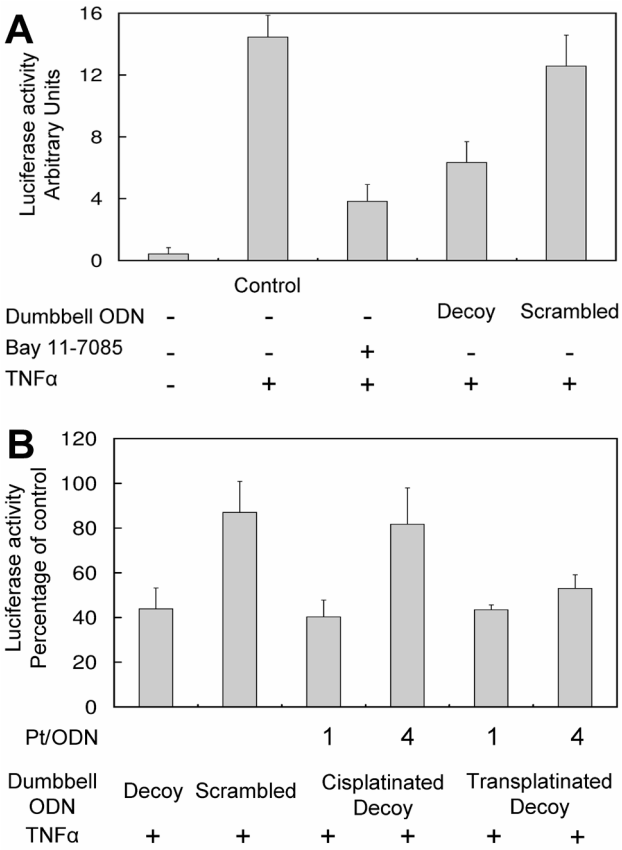


Figure 7


A
Luciferase activity
Arbitrary Units
16
12
8
4
0
Control
Dumbbell ODN - - - Decoy Scrambled
Bay 11-7085 - - + - -
TNFα - + + + +
B
Luciferase activity
Percentage of control
120
100
80
60
40
20
0
Pt/ODN 1 4 1 4
Dumbbell ODN Decoy Scrambled Cisplatinated Decoy Transplatinated Decoy
TNFα + + + + + +

Supplementary Data for:

Different Affinity of NF-κB Proteins to DNA Modified by Antitumor Cisplatin and Its Clinically Ineffective *trans* Isomer

Jana Kasparkova[1], Thomas Thibault[2], Hana Kostrhunova[1], Marie Vojtiskova[1], Patrick Midoux[2], Jean-Marc Malinge[2], Viktor Brabec[1,*]

[1]Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic; [2]Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

Materials and Methods

For competition assays, unlabeled competitor oligonucleotide probe (κB ODN modified by cisplatin or transplatin , 0-1 μM) was titrated against radiolabeled unmodified κB ODN duplex (1 nM) complexed with NF-κB protein (5 nM and 13 nM for p50/p50 and p65/p65 homodimers, respectively). By following a published protocol (1), both ODNs were mixed prior to addition of the protein at a concentration which afforded 60-80% binding of the labeled probe in the absence of competitor. Data analysis was carried out as described (2). The concentration of various competitors necessary to decrease the amount of DNA shifted in the absence of competitor twice was determined by linear regression of plots of the fraction of DNA bound in the absence of competitor divided by the fraction of DNA bound in the presence of competitor as a function of the competitor concentration.

Results

To determine the relative affinities of purified p50/p50 and p65/p65 homodimers for the different platinated duplexes containig κB site (κB ODN), competition experiments were performed using an EMSA. We compared the abilities of the platinated unlabeled κB ODN duplexes to compete with ^{32}P-labeled κB ODN duplex which was unplatinated. In agreement with previously published data (3), the dissociation constants (K_d) for complexes of p50/p50 or p65/p65 homodimers with the κB ODN duplex were found 2.3 and 3.0 nM, respectively, as determined by direct titration experiments (data not shown). Figure S1 shows typical competition experiments for which the ^{32}P-labeled duplex was mixed with different amounts of the unlabeled duplex κB ODN competitors, which were modified by cisplatin or transplatin so that the molar ratio of the oligonucleotide duplex/Pt was 1 on the average. Alternatively, unplatinated duplex κB ODN was used as a self-competitor. As expected, addition of unlabeled κB ODN duplex competed away the binding of p50/p50 homodimer to the probe as indicated by the decrease of the fraction of DNA bound to protein (migrating with reduced electrophoretic mobility). Platinated duplexes were less efficient in inhibiting binding of p50/p50 homodimer to the probe, with the duplex modified by cisplatin showing markedly lower effect. Data from competition experiments were plotted as the fractional binding of

labeled duplex κB ODN in the absence of competitor relative to binding at various competitor concentrations as a function of competitor DNA concentrations as previously reported (2) (Figure S1B). The concentration of competitor duplexes necessary to reduce κB ODN binding

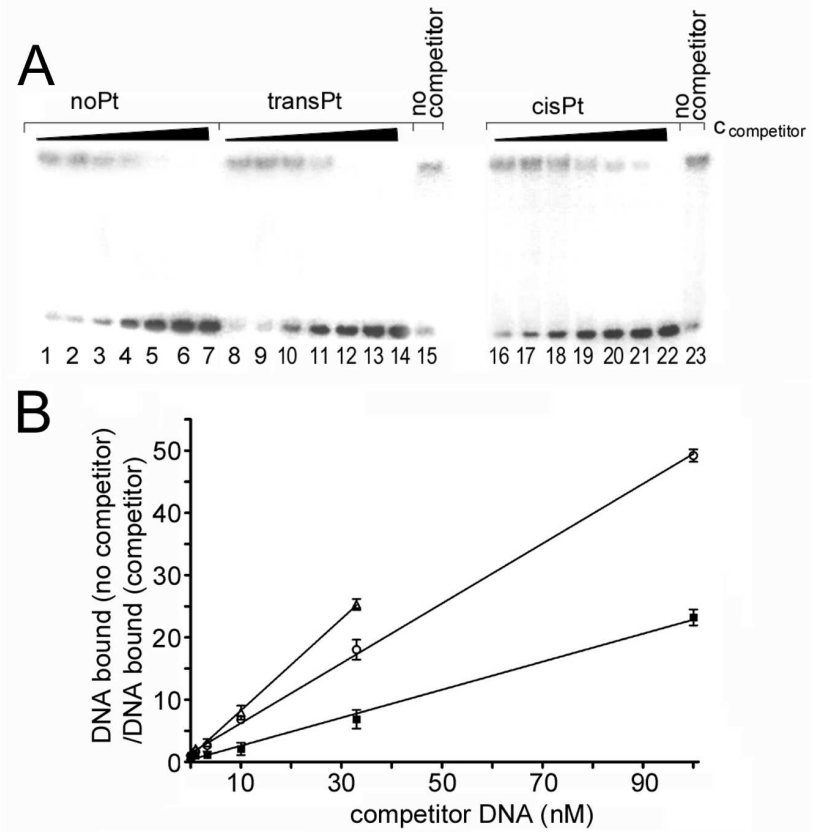


Figure S1: Relative affinities of p50/p50 homodimer binding to cisplatin- or transplatin modified DNA with respect to unmodified DNA. A. A typical titration experiment with incubation of p50/p50 homodimer (12 nM) with mixtures of ^{32}P-labeled κB ODN (1 nM) and varying concentrations of unlabeled competitor DNAs as indicated. B. Data taken from Figure S1A are plotted as the fraction of bound radiolabeled probe in the absence of unlabeled competitor divided by the fraction bound at the indicated concentrations of unlabeled competitor as a function of the concentration of unlabeled competitor DNAs: κB ODN modified by cisplatin (*solid squares*), κB ODN modified by translatin (*open circles*), and nonmodified κB ODN (self competition, *solid triangles*). Data points are means of triplicate measurements with *error bars* showing standard deviations.

by 50% was used to determine the specificity for various competitors relative to unplatinated DNA substrates. p50/p50 homodimer was found to recognize κB site containing duplex modified by cisplatin with a 6.5-fold lower affinity compared to the same unmodified duplex, whereas modification with transplatin reduced binding affinity of p50/p50 only by factor 1.3.

Similar results were obtained for p65/p65 homodimer (not shown). Using this competition approach, the relative affinities of p65/p65 homodimer to the κB ODN duplex modified by cisplatin and transplatin were found 6.7 and 1.7, respectively.

REFERENCES

1. Dunham, S.U. and Lippard, S.J. (1997) DNA sequence context and protein composition modulate HMG-domain protein recognition of ciplatin-modified DNA. *Biochemistry*, **36,** 11428-11436.
2. Fourrier, L., Brooks, P. and Malinge, J.M. (2003) Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (Base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein. *J Biol Chem*, **278,** 21267-21275.
3. Bergqvist, S., Alverdi, V., Mengel, B., Hoffmann, A., Ghosh, G. and Komives, E.A. (2009) Kinetic enhancement of NF-kB·DNA dissociation by IkBa. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106,** 19328-19333.

Conclusion générale et perspectives

Le travail présenté dans cette thèse porte d'abord sur le développement d'un nouveau type de leurre moléculaire possèdant une biostabilité sans modification chimique nucléase résistante et ouvrant la voie à un multiciblage de protéines comme des facteurs de transcription. Le développement d'une stratégie reposant sur des minicercles d'ADN a permis de répondre à cette problématique. Après avoir développé une méthode versatile de production de minicercles d'ADN, nous avons montré qu'un minicercle vectorisé contenant deux séquences de reconnaissance de NF-kB est délivré dans le cytoplasme de la cellule et inhibe ce facteur de transcription, probablement par rétention cytoplasmique de la cible, ce qui montre qu'un minicercle peut être utilisé dans la stratégie leurre moléculaire.

L'étape suivante est de faire la preuve de concept d'un multiciblage protéique par un minicercle leurre moléculaire et de montrer ses effets biologiques d'abord au niveau cellulaire.

Démontrer *in cellulo* que 3 protéines différentes interagissent en même temps sur un minicercle n'est pas simple et peut être abordé par deux techniques complémentaires. On vérifiera d'abord par RT-PCR que l'effet inhibiteur de la transcription par un minicercle est proportionnel au nombre de sites de reconnaissance du facteur de transcription contenus dans le minicercle. La même approche pourra ensuite être menée avec un minicercle possédant 3 sites de reconnaissance pour 3 facteurs de transcription différents. La preuve d'une interaction physique de plusieurs protéines sur un même minicercle dans un extrait cellulaire, pourra être obtenue par une expérience croisée de pull-down avec des anticorps dirigés contre les protéines candidates.

Pour démontrer un effet biologique, un minicercle pourra être délivré dans une lignée cellulaire cancéreuse où la croissance est liée à la suractivation concomitante de facteurs de transcription comme par exemple dans des cellules A549 de cancer pulmonaire à petites cellules (Stat3, Ets1 et NF-κB).

Afin d'améliorer la stratégie du leurre moléculaire, la délivrance des minicercles dans les cellules doit être optimisée en recherchant un système de vectorisation permettant une

délivrance si possible dans le noyau et surtout sans diminution de la survie cellulaire. Dans la mesure où les minicercles peuvent être fonctionnalisés chimiquement, l'ajout sur le minicercle de groupements cholestérol ou peptidiques fusiogènes est aussi envisagé.

Les minicercles produits dans ce travail présentent un intérêt au niveau académique. Actuellement, les interactions ADN-protéines sont étudiées en utilisant des ADN linéaires. Or, dans la cellule, l'ADN est très souvent courbé comme dans la chromatine et lors de la transcription. L'utilisation de minicercles possédant différentes séquences de nature et de positions différentes pourrait permettre de « pêcher » dans un extrait cellulaire des protéines ou des complexes protéiques ne se formant pas avec l'ADN linéaire (« protéome » du minicercle). Enfin, les minicercles présentés ici peuvent aussi être considérés comme des nanoplasmides puisqu'ils sont circulaires et peuvent être surenroulés. Ils pourraient donc servir à mieux discerner les effets de taille dans le trafic intracellulaire d'acides nucléiques circulaires en thérapie génique.

Dans une deuxième partie, nous avons utilisé la stratégie du leurre moléculaire pour étudier l'effet de la fixation du cisplatine et du transplatine sur le site de reconnaissance de facteurs de transcription. Ce système a permis de corréler les résultats obtenus *in vitro* concernant la liaison de NF-kB à des sites de reconnaissance platinés avec les résultats d'interaction *in cellulo*. La modification d'un site de reconnaissance de ce facteur de transcription par le cisplatine provoque une inhibition de la liaison, et ce, de façon plus importante qu'avec le transplatine, isomère biologiquement inactif du cisplatine.

La comparaison de l'activité de dérivés métalliques sur l'inhibition de la fixation de différents facteurs de transcription pourra être poursuivie *in cellulo* en utilisant notre stratégie du leurre moléculaire chimiquement pré modifié comme décrit dans la deuxième partie de ma thèse. En effet, la plupart des sites reconnus par les facteurs de transcription possèdent des bases qui réagissent avec les dérivés du platine. Cette stratégie peut donc être utilisée pour élargir nos connaissances sur les mécanismes de fonctionnement des dérivés du platine reliés à la transcription.

Bibliographie

1. Zamecnik, P. C. & Stephenson, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 280–284 (1978).
2. Stephenson, M. L. & Zamecnik, P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 285–288 (1978).
3. Hoehn, B. & Rossi, J. J. Nucleic Acid-based Therapies. *The Chemical Biology of Nucleic Acids* 233–260 (2010).
4. Kole, R., Krainer, A. R. & Altman, S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 125–140 (2012).
5. Kurreck, J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1628–1644 (2003).
6. Wilson, C. & Keefe, A. D. Building oligonucleotide therapeutics using non-natural chemistries. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 607–614 (2006).
7. Eckstein, F. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **10**, 117–121 (2000).
8. Guvakova, M. A., Yakubov, L. A., Vlodavsky, I., Tonkinson, J. L. & Stein, C. A. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **270**, 2620–2627 (1995).
9. Manoharan, M. 2'-carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**, 117–130 (1999).
10. Crooke, S. T. *et al.* Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes. *Biochem. J.* **312 (Pt 2)**, 599–608 (1995).
11. Zamaratski, E., Pradeepkumar, P. I. & Chattopadhyaya, J. 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 (2001).
12. Baker, B. F. *et al.* 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 (1997).
13. Koshkin, A. A. & Wengel, J. Synthesis of Novel 2',3'-Linked Bicyclic Thymine Ribonucleosides. *J. Org. Chem.* **63**, 2778–2781 (1998).
14. Kumar, R. *et al.* The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2219–2222 (1998).
15. Marwick, C. First 'antisense' drug will treat CMV retinitis. *JAMA* **280**, 871 (1998).
16. Yacyshyn, B. *et al.* A randomized, double-masked, placebo-controlled study of alicaforsen, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule 1, for the treatment of subjects with active Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 215–220 (2007).
17. van Deventer, S. J. H. *et al.* A phase II dose ranging, double-blind, placebo-controlled study of alicaforsen enema in subjects with acute exacerbation of mild to moderate left-sided ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 1415–1425 (2006).
18. Waters, J. S. *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 1812–1823 (2000).
19. Garber, K. New apoptosis drugs face critical test. *Nat. Biotechnol.* **23**, 409–411 (2005).

20. Pirollo, K. F., Rait, A., Sleer, L. S. & Chang, E. H. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol. Ther.* **99**, 55–77 (2003).
21. Moreira, J. N., Santos, A. & Simões, S. Bcl-2-targeted antisense therapy (Oblimersen sodium): towards clinical reality. *Rev Recent Clin Trials* **1**, 217–235 (2006).
22. Pro, B. *et al.* Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* **143**, 355–360 (2008).
23. Dean, N. M., McKay, R., Condon, T. P. & Bennett, C. F. Inhibition of protein kinase C-alpha expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **269**, 16416–16424 (1994).
24. Paz-Ares, L. *et al.* Phase III study of gemcitabine and cisplatin with or without aprinocarsen, a protein kinase C-alpha antisense oligonucleotide, in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1428–1434 (2006).
25. Hashizume, R. *et al.* New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163. *Neuro-oncology* **10**, 112–120 (2008).
26. Benchaouir, R. *et al.* Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* **1**, 646–657 (2007).
27. Macejak, D. G. *et al.* Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* **31**, 769–776 (2000).
28. Peracchi, A. Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes. *Rev. Med. Virol.* **14**, 47–64 (2004).
29. Zinnen, S. P. *et al.* Selection, design, and characterization of a new potentially therapeutic ribozyme. *RNA* **8**, 214–228 (2002).
30. Scherer, L. J. & Rossi, J. J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1457–1465 (2003).
31. Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 23–36 (2007).
32. Burnett, J. C. & Rossi, J. J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* **19**, 60–71 (2012).
33. Jackson, A. L. & Linsley, P. S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 57–67 (2010).
34. Soutschek, J. *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**, 173–178 (2004).
35. Heidel, J. D., Hu, S., Liu, X. F., Triche, T. J. & Davis, M. E. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1579–1582 (2004).
36. Minakuchi, Y. *et al.* Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* **32**, e109 (2004).
37. Marques, J. T. & Williams, B. R. G. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1399–1405 (2005).
38. Hickerson, R. P. *et al.* Stability study of unmodified siRNA and relevance to clinical use. *Oligonucleotides* **18**, 345–354 (2008).
39. Tomita, N. *et al.* Development of novel decoy oligonucleotides: advantages of circular dumb-bell decoy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **5**, 107–112 (2003).
40. Morrissey, D. V. *et al.* Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1002–1007 (2005).
41. Zimmermann, T. S. *et al.* RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**, 111–114 (2006).

42. Pal, A. *et al.* Systemic delivery of RafsiRNA using cationic cardiolipin liposomes silences Raf-1 expression and inhibits tumor growth in xenograft model of human prostate cancer. *Int. J. Oncol.* **26**, 1087–1091 (2005).
43. Kim, D. H. & Rossi, J. J. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 173–184 (2007).
44. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.* **11**, 50–55 (2005).
45. Singerman, L. Combination therapy using the small interfering RNA bevasiranib. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **29**, S49–50 (2009).
46. Schlosser, K. & Li, Y. Biologically inspired synthetic enzymes made from DNA. *Chem. Biol.* **16**, 311–322 (2009).
47. Reyes-Gutiérrez, P. & Alvarez-Salas, L. M. Cleavage of HPV-16 E6/E7 mRNA mediated by modified 10-23 deoxyribozymes. *Oligonucleotides* **19**, 233–242 (2009).
48. Guianvrac'h, C. G. D. & Benhida, R. Triple hélice d'ADN. Synthèse de Nouvelles Super-bases pour la Reconnaissance de la Paire Watson-Crick AT.
49. Simon, P., Cannata, F., Concordet, J.-P. & Giovannangeli, C. Targeting DNA with triplex-forming oligonucleotides to modify gene sequence. *Biochimie* **90**, 1109–1116 (2008).
50. Goodchild, J. Therapeutic oligonucleotides. *Methods Mol. Biol.* **764**, 1–15 (2011).
51. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).
52. Shamah, S. M., Healy, J. M. & Cload, S. T. Complex target SELEX. *Acc. Chem. Res.* **41**, 130–138 (2008).
53. Cerchia, L. *et al.* Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biol.* **3**, e123 (2005).
54. Burmeister, P. E. *et al.* Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem. Biol.* **12**, 25–33 (2005).
55. Schmidt, K. S. *et al.* Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5757–5765 (2004).
56. Boomer, R. M. *et al.* Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. *Oligonucleotides* **15**, 183–195 (2005).
57. Tucker, C. E. *et al.* Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **732**, 203–212 (1999).
58. Thiel, K. W. & Giangrande, P. H. Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides* **19**, 209–222 (2009).
59. Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr, Feinsod, M. & Guyer, D. R. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2805–2816 (2004).
60. Fraunfelder, F. W. Pegaptanib for wet macular degeneration. *Drugs Today* **41**, 703–709 (2005).
61. Ruckman, J. *et al.* 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 20556–20567 (1998).
62. Wurster, S. E. & Maher, L. J., 3rd Selection and characterization of anti-NF-kappaB p65 RNA aptamers. *RNA* **14**, 1037–1047 (2008).
63. Bassett, S. E. *et al.* Combinatorial selection and edited combinatorial selection of phosphorothioate aptamers targeting human nuclear factor-kappaB RelA/p50 and RelA/RelA. *Biochemistry* **43**, 9105–9115 (2004).

64. Huang, D.-B. *et al.* Crystal structure of NF-kappaB (p50)2 complexed to a high-affinity RNA aptamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9268–9273 (2003).
65. Jing, N. *et al.* Targeting signal transducer and activator of transcription 3 with G-quartet oligonucleotides: a potential novel therapy for head and neck cancer. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 279–286 (2006).
66. Jing, N. *et al.* Targeting Stat3 with G-quartet oligodeoxynucleotides in human cancer cells. *DNA Cell Biol.* **22**, 685–696 (2003).
67. Ireson, C. R. & Kelland, L. R. Discovery and development of anticancer aptamers. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2957–2962 (2006).
68. Rosenberg, J. E. *et al.* A phase II, single-arm study of AS1411 in metastatic renal cell carcinoma (RCC). (2010).
69. Borghouts, C. *et al.* A membrane penetrating peptide aptamer inhibits STAT3 function and suppresses the growth of STAT3 addicted tumor cells. *JAK-STAT* **1**, 44–54 (2012).
70. Bielinska, A., Shivdasani, R. A., Zhang, L. Q. & Nabel, G. J. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* **250**, 997–1000 (1990).
71. Morishita, R. *et al.* A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5855–5859 (1995).
72. Morishita, R., Higaki, J., Tomita, N. & Ogihara, T. Application of Transcription Factor 'Decoy' Strategy as Means of Gene Therapy and Study of Gene Expression in Cardiovascular Disease. 1023–1028 (1998).
73. Morishita, R., Higaki, J., Tomita, N. & Ogihara, T. Application of transcription factor 'decoy' strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **82**, 1023–1028 (1998).
74. Tavitian, B. In vivo imaging with oligonucleotides for diagnosis and drug development. *Gut* **52 Suppl 4**, iv40–47 (2003).
75. Crinelli, R., Bianchi, M., Gentilini, L. & Magnani, M. Design and characterization of decoy oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2435–2443 (2002).
76. Crinelli, R., Bianchi, M., Gentilini, L., Palma, L. & Magnani, M. Locked nucleic acids (LNA): versatile tools for designing oligonucleotide decoys with high stability and affinity. *Curr Drug Targets* **5**, 745–752 (2004).
77. De Stefano, D., De Rosa, G. & Carnuccio, R. NFkappaB decoy oligonucleotides. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **12**, 203–213 (2010).
78. Mischiati, C. *et al.* Interaction of the human NF-kappaB p52 transcription factor with DNA-PNA hybrids mimicking the NF-kappaB binding sites of the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J. Biol. Chem.* **274**, 33114–33122 (1999).
79. Romanelli, A. *et al.* Molecular interactions with nuclear factor kappaB (NF-kappaB) transcription factors of a PNA-DNA chimera mimicking NF-kappaB binding sites. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6066–6075 (2001).
80. Borgatti, M. *et al.* Resistance of decoy PNA-DNA chimeras to enzymatic degradation in cellular extracts and serum. *Oncol. Res.* **13**, 279–287 (2003).
81. Cooper, J. A., Jr *et al.* Attenuation of interleukin-8 production by inhibiting nuclear factor-kappaB translocation using decoy oligonucleotides. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 605–613 (2000).
82. Jo, N. *et al.* Effective transfection of a cis element 'decoy' of the nuclear factor-kappaB binding site into the experimental choroidal neovascularization. *Curr. Eye Res.* **24**, 465–473 (2002).

83. De Rosa, G. *et al.* Enhanced intracellular uptake and inhibition of NF-kappaB activation by decoy oligonucleotide released from PLGA microspheres. *J Gene Med* **7**, 771–781 (2005).
84. Crinelli, R., Bianchi, M., Gentilini, L. & Magnani, M. Design and characterization of decoy oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2435–2443 (2002).
85. Osako, M. K. *et al.* Increase in nuclease resistance and incorporation of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides by modification of the 3'-terminus. *J Gene Med* **9**, 812–819 (2007).
86. Leong, P. L. *et al.* Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4138–4143 (2003).
87. Suzuki, Y., Nishida, Y., Naruse, T., Gemba, T. & Ishiguro, N. Pericellular matrix formation alters the efficiency of intracellular uptake of oligonucleotides in osteosarcoma cells. *J. Surg. Res.* **152**, 148–156 (2009).
88. Dinh, T. D., Higuchi, Y., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Evaluation of osteoclastogenesis via NFκB decoy/mannosylated cationic liposome-mediated inhibition of pro-inflammatory cytokine production from primary cultured macrophages. *Pharm. Res.* **28**, 742–751 (2011).
89. Timchenko, M. A. *et al.* Modified DNA fragments specifically and irreversibly bind transcription factor NF-kappaB in lysates of human tumor cells. *Biochemistry Mosc.* **71**, 454–460 (2006).
90. De Rosa, G. *et al.* Novel cationic liposome formulation for the delivery of an oligonucleotide decoy to NF-kappaB into activated macrophages. *Eur J Pharm Biopharm* **70**, 7–18 (2008).
91. Griesenbach, U. *et al.* Cytoplasmic deposition of NFkappaB decoy oligonucleotides is insufficient to inhibit bleomycin-induced pulmonary inflammation. *Gene Ther.* **9**, 1109–1115 (2002).
92. Pichon, C., Billiet, L. & Midoux, P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 640–645 (2010).
93. Tomita, N. *et al.* An oligonucleotide decoy for transcription factor E2F inhibits mesangial cell proliferation in vitro. *Am. J. Physiol.* **275**, F278–284 (1998).
94. Zhang, X., Zhang, J., Wang, L., Wei, H. & Tian, Z. Therapeutic effects of STAT3 decoy oligodeoxynucleotide on human lung cancer in xenograft mice. 149 (2007).
95. Laguillier, C. *et al.* Cell death in NF-kappaB-dependent tumour cell lines as a result of NF-kappaB trapping by linker-modified hairpin decoy oligonucleotide. *FEBS Lett.* **581**, 1143–1150 (2007).
96. Tadlaoui Hbibi, A. *et al.* Efficient killing of SW480 colon carcinoma cells by a signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 hairpin decoy oligodeoxynucleotide--interference with interferon-gamma-STAT1-mediated killing. *FEBS J.* **276**, 2505–2515 (2009).
97. Souissi, I. *et al.* A STAT3-decoy oligonucleotide induces cell death in a human colorectal carcinoma cell line by blocking nuclear transfer of STAT3 and STAT3-bound NF-κB. *BMC Cell Biol.* **12**, 14 (2011).
98. Wijagkanalan, W., Kawakami, S., Higuchi, Y., Yamashita, F. & Hashida, M. Intratracheally instilled mannosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes for effective prevention of LPS-induced lung inflammation. *J Control Release* **149**, 42–50 (2011).
99. Shibuya, T. *et al.* A double-strand decoy DNA oligomer for NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced ICAM-1 expression in sinusoidal endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 10–16 (2002).

100. Bhattacharya, R., Osburg, B., Fischer, D. & Bickel, U. Targeted delivery of complexes of biotin-PEG-polyethylenimine and NF-kappaB decoys to brain-derived endothelial cells in vitro. *Pharm. Res.* **25**, 605–615 (2008).
101. Bene, A., Kurten, R. C. & Chambers, T. C. Subcellular localization as a limiting factor for utilization of decoy oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **32**, e142 (2004).
102. Hu, Y. *et al.* [Regulation of tissue factor expression in brain microvascular endothelial cells by PLA nanoparticles coating NF-kappaB decoy oligonucleotides]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **26**, 534–538 (2005).
103. Wang, H. *et al.* Inhibition of tissue factor expression in brain microvascular endothelial cells by nanoparticles loading NF-kappaB decoy oligonucleotides. *Int J Mol Sci* **9**, 1851–1862 (2008).
104. Zhang, Q., Li, Y., Shi, Y. & Zhang, Y. HVJ envelope vector, a versatile delivery system: its development, application, and perspectives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 345–349 (2008).
105. Son, G. *et al.* Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G631–639 (2007).
106. Tahara, K. *et al.* Oral nuclear factor-κB decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease. *Biomaterials* **32**, 870–878 (2011).
107. Okada One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **28**, 43–70 (1997).
108. Sakaguchi, M. *et al.* Targeted disruption of transcriptional regulatory function of p53 by a novel efficient method for introducing a decoy oligonucleotide into nuclei. *Nucleic Acids Res.* **33**, e88 (2005).
109. Tranter, M. *et al.* In vivo delivery of nucleic acids via glycopolymer vehicles affords therapeutic infarct size reduction in vivo. *Mol. Ther.* **20**, 601–608 (2012).
110. Liu, Y., Quan, F., Wang, J. & Bai, X. [Nuclear localization of oligonucleotides decoy effect on nuclear factor-kappaB activity]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **26**, 1683–1689 (2010).
111. Kim, D.-W. *et al.* Modulation of biological processes in the nucleus by delivery of DNA oligonucleotides conjugated with gold nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 2593–2604 (2011).
112. Sen, M. *et al.* First-in-Human Trial of a STAT3 Decoy Oligonucleotide in Head and Neck Tumors: Implications for Cancer Therapy. *Cancer Discov* **2**, 694–705 (2012).
113. Mann, M. J. *et al.* Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* **354**, 1493–1498 (1999).
114. Ehsan, A., Mann, M. J., Dell'Acqua, G. & Dzau, V. J. Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligonucleotide gene therapy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **121**, 714–722 (2001).
115. Dzau, V. J. Transcription factor decoy. 1234–1236 (2002).
116. Lopes, R. D. *et al.* Edifoligide and long-term outcomes after coronary artery bypass grafting: PRoject of Ex-vivo Vein graft ENgineering via Transfection IV (PREVENT IV) 5-year results. *Am. Heart J.* **164**, 379–386.e1 (2012).
117. Osako, M. K., Nakagami, H. & Morishita, R. Development and Modification of Decoy Oligodeoxynucleotides for Clinical Application. (2011).
118. Morishita, R. *et al.* In vivo transfection of cis element 'decoy' against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat. Med.* **3**, 894–899 (1997).

119. Suzuki, J., Morishita, R., Amano, J., Kaneda, Y. & Isobe, M. Decoy against nuclear factor-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Ther.* **7**, 1847–1852 (2000).
120. Suzuki, J., Isobe, M., Morishita, R. & Nagai, R. Nucleic acid drugs for prevention of cardiac rejection. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 916514 (2009).
121. Kawauchi, M. *et al.* Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates. *Circ. Res.* **87**, 1063–1068 (2000).
122. Yoshimura, S. *et al.* Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther.* **8**, 1635–1642 (2001).
123. Jun-Ichi, S. *et al.* Initial clinical cases of the use of a NF-kappaB decoy at the site of coronary stenting for the prevention of restenosis. *Circ. J.* **68**, 270–271 (2004).
124. Suzuki, J.-I., Tezuka, D., Morishita, R. & Isobe, M. An initial case of suppressed restenosis with nuclear factor-kappa B decoy transfection after percutaneous coronary intervention. *J Gene Med* **11**, 89–91 (2009).
125. Osako, M. K., Nakagami, H. & Morishita, R. Modification of Decoy Oligodeoxynucleotides to achieve the stability and therapeutic efficacy. *Current topics in medicinal chemistry* (2012).
126. Gao, H. *et al.* A single decoy oligodeoxynucleotides targeting multiple oncoproteins produces strong anticancer effects. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1621–1629 (2006).
127. Nakashima, H. *et al.* Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor kappaB and ets transcription factors. *Circulation* **109**, 132–138 (2004).
128. Miyake, T. *et al.* Prevention of abdominal aortic aneurysms by simultaneous inhibition of NFkappaB and ets using chimeric decoy oligonucleotides in a rabbit model. *Gene Ther.* **13**, 695–704 (2006).
129. Miyake, T. *et al.* Systemic administration of ribbon-type decoy oligodeoxynucleotide against nuclear factor κB and ets prevents abdominal aortic aneurysm in rat model. *Mol. Ther.* **19**, 181–187 (2011).
130. Quanz, M. *et al.* Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1308–1316 (2009).
131. Quanz, M. *et al.* Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response. *PLoS ONE* **4**, e6298 (2009).
132. Devun, F. *et al.* Preclinical study of the DNA repair inhibitor Dbait in combination with chemotherapy in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* **47**, 266–275 (2012).
133. Berthault, N. *et al.* Comparison of distribution and activity of nanoparticles with short interfering DNA (Dbait) in various living systems. *Cancer Gene Ther.* **18**, 695–706 (2011).
134. Warncke, S., Gégout, A. & Carell, T. Phosphorothioation of oligonucleotides strongly influences the inhibition of bacterial (M.HhaI) and human (Dnmt1) DNA methyltransferases. *Chembiochem* **10**, 728–734 (2009).
135. Zent, C. S. *et al.* Phase I clinical trial of CpG oligonucleotide 7909 (PF-03512676) in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **53**, 211–217 (2012).
136. Klem, R. E. Methods and compositions for treating a cell-proliferative disorder using CRE decoy oligomers, Bcl-2 antisense oligomers, and hybrid oligomers thereof. (2006).
137. Müller, C. W. Transcription factors: global and detailed views. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 26–32 (2001).

138. Ashok Reddy, D., Prasad, B. V. L. . & Mitra, C. Functional classification of transcription factor binding sites: Information content as a metric. *Journal of Integrative Bioinformatics* **3**, (2006).
139. Panne, D. The enhanceosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 236–242 (2008).
140. Maniatis, T. *et al.* Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 609–620 (1998).
141. Matys, V. *et al.* TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **34**, D108–110 (2006).
142. Bryne, J. C. *et al.* JASPAR, the open access database of transcription factor-binding profiles: new content and tools in the 2008 update. *Nucleic Acids Res.* **36**, D102–106 (2008).
143. Weiss, M. A. *et al.* Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* **347**, 575–578 (1990).
144. Stegmaier, P., Kel, A. E. & Wingender, E. Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Inform* **15**, 276–286 (2004).
145. Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K. & Harrison, S. C. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**, 1223–1237 (1992).
146. Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 933–969 (1990).
147. Lagunas, V. M. & Meléndez-Zajgla, J. Nuclear Factor-kappa B as a Resistance Factor to Platinum-Based Antineoplasic Drugs. 576104 (2008).
148. Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706–6716 (2006).
149. Ghosh, S. & Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81–96 (2002).
150. Barnes, P. J. & Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066–1071 (1997).
151. Roff, M. *et al.* Role of IkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo. *J. Biol. Chem.* **271**, 7844–7850 (1996).
152. Scherer, D. C., Brockman, J. A., Chen, Z., Maniatis, T. & Ballard, D. W. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 11259–11263 (1995).
153. Thanos, D. & Maniatis, T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**, 529–532 (1995).
154. Arenzana-Seisdedos, F. *et al.* Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2689–2696 (1995).
155. Perkins, N. D. & Gilmore, T. D. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ.* **13**, 759–772 (2006).
156. Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q. & Ghosh, G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* **391**, 410–413 (1998).
157. Mohamed, M. R. & McFadden, G. NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle* **8**, 3125–3132 (2009).
158. Rayet, B. & Gélinas, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18**, 6938–6947 (1999).
159. Higgins, K. A. *et al.* Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 9901–9905 (1993).

160. Lin, Y. Z., Yao, S. Y., Veach, R. A., Torgerson, T. R. & Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 14255–14258 (1995).
161. Bargou, R. C. *et al.* Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 2961–2969 (1997).
162. Wang, C. Y., Cusack, J. C., Jr, Liu, R. & Baldwin, A. S., Jr Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat. Med.* **5**, 412–417 (1999).
163. Puls, L. N., Eadens, M. & Messersmith, W. Current status of SRC inhibitors in solid tumor malignancies. *Oncologist* **16**, 566–578 (2011).
164. Stella, G. M. *et al.* Targeting EGFR in non-small-cell lung cancer: lessons, experiences, strategies. *Respir Med* **106**, 173–183 (2012).
165. Lu, J.-J., Pan, W., Hu, Y.-J. & Wang, Y.-T. Multi-target drugs: the trend of drug research and development. *PLoS ONE* **7**, e40262 (2012).
166. Frantz, S. Drug discovery: playing dirty. *Nature* **437**, 942–943 (2005).
167. Yap, T. A. *et al.* AT13148 is a novel, oral multi-AGC kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3912–3923 (2012).
168. Pradhan, M. P., Prasad, N. K. & Palakal, M. J. A systems biology approach to the global analysis of transcription factors in colorectal cancer. *BMC Cancer* **12**, 331 (2012).
169. Grivennikov, S. I. & Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 11–19 (2010).
170. Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 41–51 (2007).
171. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z.-W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 301–310 (2002).
172. Karin, M. & Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221–227 (2002).
173. Haura, E. B., Turkson, J. & Jove, R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **2**, 315–324 (2005).
174. Squarize, C. H., Castilho, R. M., Sriuranpong, V., Pinto, D. S., Jr & Gutkind, J. S. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **8**, 733–746 (2006).
175. Lee, H. *et al.* Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* **15**, 283–293 (2009).
176. Zhang, W.-D., Liu, J., Wang, L.-S. & Pan, T.-W. Identifying genes related with non-small cell lung cancer via transcription factors-target genes relationship. *International Journal of the Physical Sciences* **6**, 6450–6457 (2011).
177. Dooley, A. L. *et al.* Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes Dev.* **25**, 1470–1475 (2011).
178. Ebert, M. S. & Sharp, P. A. Emerging roles for natural microRNA sponges. *Curr. Biol.* **20**, R858–861 (2010).
179. Ebert, M. S. & Sharp, P. A. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* **16**, 2043–2050 (2010).
180. Kreiss, P. *et al.* Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3792–3798 (1999).

181. Yin, W., Xiang, P. & Li, Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Anal. Biochem.* **346**, 289–294 (2005).
182. Hsu, C. Y. M. & Uludağ, H. Effects of size and topology of DNA molecules on intracellular delivery with non-viral gene carriers. *BMC Biotechnol.* **8**, 23 (2008).
183. Robertson, R. M., Laib, S. & Smith, D. E. Diffusion of isolated DNA molecules: dependence on length and topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7310–7314 (2006).
184. Catanese, D. J., Jr, Fogg, J. M., Schrock, D. E., 2nd, Gilbert, B. E. & Zechiedrich, L. Supercoiled Minivector DNA resists shear forces associated with gene therapy delivery. *Gene Ther.* **19**, 94–100 (2012).
185. Zhao, N., Fogg, J. M., Zechiedrich, L. & Zu, Y. Transfection of shRNA-encoding Minivector DNA of a few hundred base pairs to regulate gene expression in lymphoma cells. *Gene Ther.* **18**, 220–224 (2011).
186. Schwarz, L. A. *et al.* Delivery of DNA-cationic liposome complexes by small-particle aerosol. *Hum. Gene Ther.* **7**, 731–741 (1996).
187. Stern, M. *et al.* The effects of jet nebulisation on cationic liposome-mediated gene transfer in vitro. *Gene Ther.* **5**, 583–593 (1998).
188. Ackermann, D. *et al.* A double-stranded DNA rotaxane. *Nat Nanotechnol* **5**, 436–442 (2010).
189. Gonçalves, D. P. N., Schmidt, T. L., Koeppel, M. B. & Heckel, A. DNA minicircles connected via G-quadruplex interaction modules. *Small* **6**, 1347–1352 (2010).
190. Mayer, G., Ackermann, D., Kuhn, N. & Famulok, M. Construction of DNA architectures with RNA hairpins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 971–973 (2008).
191. Lohmann, F., Ackermann, D. & Famulok, M. Reversible light switch for macrocycle mobility in a DNA rotaxane. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11884–11887 (2012).
192. Blackwood, E. M. & Kadonaga, J. T. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* **281**, 60–63 (1998).
193. Wong, O. K., Guthold, M., Erie, D. A. & Gelles, J. Interconvertible lac repressor-DNA loops revealed by single-molecule experiments. *PLoS Biol.* **6**, e232 (2008).
194. Müller, J., Oehler, S. & Müller-Hill, B. Repression of lac promoter as a function of distance, phase and quality of an auxiliary lac operator. *J. Mol. Biol.* **257**, 21–29 (1996).
195. Krämer, H. *et al.* lac repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced lac operators. *EMBO J.* **6**, 1481–1491 (1987).
196. TenHarmsel, A., Austin, R. J., Savenelli, N. & Biggin, M. D. Cooperative binding at a distance by even-skipped protein correlates with repression and suggests a mechanism of silencing. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2742–2752 (1993).
197. Wang, J. C. Interactions between twisted DNAs and enzymes: the effects of superhelical turns. *J. Mol. Biol.* **87**, 797–816 (1974).
198. Mirkin, S. M., Bogdanova, E. S., Gorlenko, Z. M., Gragerov, A. I. & Larionov, O. A. DNA supercoiling and transcription in Escherichia coli: influence of RNA polymerase mutations. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 169–175 (1979).
199. Revyakin, A., Ebright, R. H. & Strick, T. R. Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4776–4780 (2004).
200. Qureshi, M., Eydmann, T., Austin, S. & Dixon, R. Torsional constraints on the formation of open promoter complexes on DNA minicircles carrying sigma 54-dependent promoters. *Biochemistry* **36**, 12303–12316 (1997).
201. Gopal, V., Brieba, L. G., Guajardo, R., McAllister, W. T. & Sousa, R. Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and a role for the non-template strand in RNA displacement. *J. Mol. Biol.* **290**, 411–431 (1999).

202. Lionberger, T. A. & Meyhöfer, E. Bending the rules of transcriptional repression: tightly looped DNA directly represses T7 RNA polymerase. *Biophys. J.* **99**, 1139–1148 (2010).
203. Singh, B. N. & Hampsey, M. A transcription-independent role for TFIIB in gene looping. *Mol. Cell* **27**, 806–816 (2007).
204. Tan-Wong, S. M. *et al.* Gene Loops Enhance Transcriptional Directionality. *Science* **338**, 671–675 (2012).
205. Lionberger, T. A. & Meyhöfer, E. Bending the rules of transcriptional repression: tightly looped DNA directly represses T7 RNA polymerase. *Biophys. J.* **99**, 1139–1148 (2010).
206. Vafabakhsh, R. & Ha, T. Extreme bendability of DNA less than 100 base pairs long revealed by single-molecule cyclization. *Science* **337**, 1097–1101 (2012).
207. Cohen, S. & Segal, D. Extrachromosomal circular DNA in eukaryotes: possible involvement in the plasticity of tandem repeats. *Cytogenet. Genome Res.* **124**, 327–338 (2009).
208. Gaubatz, J. W. Extrachromosomal circular DNAs and genomic sequence plasticity in eukaryotic cells. *Mutat. Res.* **237**, 271–292 (1990).
209. Assum, G., Fink, T., Steinbeisser, T. & Fisel, K. J. Analysis of human extrachromosomal DNA elements originating from different beta-satellite subfamilies. *Hum. Genet.* **91**, 489–495 (1993).
210. Assum, G., Böckle, B., Fink, T., Dmochewitz, U. & Krone, W. Restriction analysis of chromosomal sequences homologous to single-copy fragments cloned from small polydisperse circular DNA (spcDNA). *Hum. Genet.* **82**, 249–254 (1989).
211. Motejlek, K., Schindler, D., Assum, G. & Krone, W. Increased amount and contour length distribution of small polydisperse circular DNA (spcDNA) in Fanconi anemia. *Mutat. Res.* **293**, 205–214 (1993).
212. Motejlek, K., Assum, G., Krone, W. & Kleinschmidt, A. K. The size of small polydisperse circular DNA (spcDNA) in angiofibroma-derived cell cultures from patients with tuberous sclerosis (TSC) differs from that in fibroblasts. *Hum. Genet.* **87**, 6–10 (1991).
213. Cohen, S. & Mechali, M. A novel cell-free system reveals a mechanism of circular DNA formation from tandem repeats. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2542–2548 (2001).
214. Cohen, S. & Lavi, S. Induction of circles of heterogeneous sizes in carcinogen-treated cells: two-dimensional gel analysis of circular DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2002–2014 (1996).
215. Cohen, S., Yacobi, K. & Segal, D. Extrachromosomal circular DNA of tandemly repeated genomic sequences in Drosophila. *Genome Res.* **13**, 1133–1145 (2003).
216. Cohen, S., Regev, A. & Lavi, S. Small polydispersed circular DNA (spcDNA) in human cells: association with genomic instability. *Oncogene* **14**, 977–985 (1997).
217. Gilson, E. & Géli, V. How telomeres are replicated. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 825–838 (2007).
218. McEachern, M. J., Krauskopf, A. & Blackburn, E. H. Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 331–358 (2000).
219. Verdun, R. E. & Karlseder, J. Replication and protection of telomeres. *Nature* **447**, 924–931 (2007).
220. Tomaska, L., Nosek, J., Kramara, J. & Griffith, J. D. Telomeric circles: universal players in telomere maintenance? *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1010–1015 (2009).
221. Nosek, J., Kosa, P. & Tomaska, L. On the origin of telomeres: a glimpse at the pre-telomerase world. *Bioessays* **28**, 182–190 (2006).

222. Tomaska, L., McEachern, M. J. & Nosek, J. Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles. *FEBS Lett.* **567**, 142–146 (2004).
223. Cloutier, T. E. & Widom, J. Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA. *Mol. Cell* **14**, 355–362 (2004).
224. Horowitz, D. S. & Wang, J. C. Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **173**, 75–91 (1984).
225. Shore, D., Langowski, J. & Baldwin, R. L. DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4833–4837 (1981).
226. Hagerman, P. J. Flexibility of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **17**, 265–286 (1988).
227. Cloutier, T. E. & Widom, J. Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA. *Mol. Cell* **14**, 355–362 (2004).
228. Du, Q., Smith, C., Shiffeldrim, N., Vologodskaia, M. & Vologodskii, A. Cyclization of short DNA fragments and bending fluctuations of the double helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 5397–5402 (2005).
229. Marini, J. C., Levene, S. D., Crothers, D. M. & Englund, P. T. Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7664–7668 (1982).
230. Trifonov, E. N. Sequence-dependent deformational anisotropy of chromatin DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 4041–4053 (1980).
231. Mengeritsky, G. & Trifonov, E. N. Nucleotide sequence-directed mapping of the nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* **11**, 3833–3851 (1983).
232. Trifonov, E. N. Curved DNA. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **19**, 89–106 (1985).
233. Du, Q., Kotlyar, A. & Vologodskii, A. Kinking the double helix by bending deformation. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1120–1128 (2008).
234. Kumar, R. *et al.* Template-directed oligonucleotide strand ligation, covalent intramolecular DNA circularization and catenation using click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6859–6864 (2007).
235. Zechiedrich, E. L., Fogg, J. & Perona, J. Generation of minicircle DNA with physiological supercoiling. (2009).
236. Fogg, J. M. *et al.* Exploring writhe in supercoiled minicircle DNA. *J Phys Condens Matter* **18**, S145–S159 (2006).
237. Zheng, X. & Vologodskii, A. Theoretical analysis of disruptions in DNA minicircles. *Biophys. J.* **96**, 1341–1349 (2009).
238. Crick, F. H. & Klug, A. Kinky helix. *Nature* **255**, 530–533 (1975).
239. Suzuki, M. & Yagi, N. Stereochemical basis of DNA bending by transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2083–2091 (1995).
240. Werner, M. H., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. Intercalation, DNA kinking, and the control of transcription. *Science* **271**, 778–784 (1996).
241. Dickerson, R. E. DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1906–1926 (1998).
242. Diffley, J. F. & Stillman, B. A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7864–7868 (1991).
243. Beest, M. van *et al.* Sequence-specific High Mobility Group Box Factors Recognize 10–12-Base Pair Minor Groove Motifs. *J. Biol. Chem.* **275**, 27266–27273 (2000).
244. Fang, Y. *et al.* Antitumor activity of NF-kB decoy oligodeoxynucleotides in a prostate cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **12**, 2721–2726 (2011).
245. Jing, N., Sha, W., Li, Y., Xiong, W. & Tweardy, D. J. Rational drug design of G-quartet DNA as anti-cancer agents. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 2841–2854 (2005).

246. Jing, N. & Tweardy, D. J. Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs* **16**, 601–607 (2005).
247. Leeman, R. J., Lui, V. W. Y. & Grandis, J. R. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 231–241 (2006).
248. Sun, Z., Yao, Z., Liu, S., Tang, H. & Yan, X. An oligonucleotide decoy for Stat3 activates the immune response of macrophages to breast cancer. *Immunobiology* **211**, 199–209 (2006).
249. Mann, M. J. & Dzau, V. J. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J. Clin. Invest.* **106**, 1071–1075 (2000).
250. Lu, J.-J., Pan, W., Hu, Y.-J. & Wang, Y.-T. Multi-target drugs: the trend of drug research and development. *PLoS ONE* **7**, e40262 (2012).
251. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. & Subramani, S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 725–737 (1987).
252. van Dijk, M. & Bonvin, A. M. J. J. 3D-DART: a DNA structure modelling server. *Nucleic Acids Res.* **37**, W235–239 (2009).
253. Case, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **26**, 1668–1688 (2005).
254. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
255. Houk, B. E., Hochhaus, G. & Hughes, J. A. Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma. *AAPS PharmSci* **1**, E9 (1999).
256. Phelps, C. B., Sengchanthalangsy, L. L., Malek, S. & Ghosh, G. Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers. *J. Biol. Chem.* **275**, 24392–24399 (2000).
257. Aharoni-Simon, M., Reifen, R. & Tirosh, O. ROS-production-mediated activation of AP-1 but not NFkappaB inhibits glutamate-induced HT4 neuronal cell death. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1339–1349 (2006).
258. Shimizu, H. *et al.* NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts. *Gene Ther.* **13**, 933–941 (2006).
259. Di Giusto, D. A. & King, G. C. Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. 46483–46489 (2004).
260. Sasaki, A. & Kinjo, M. Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties. *J Control Release* **143**, 104–111 (2010).
261. Seth, A. & Watson, D. K. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur. J. Cancer* **41**, 2462–2478 (2005).
262. Fitzsimmons, D. *et al.* Highly cooperative recruitment of Ets-1 and release of autoinhibition by Pax5. *J. Mol. Biol.* **392**, 452–464 (2009).
263. Baillat, D., Laitem, C., Leprivier, G., Margerin, C. & Aumercier, M. Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 213–217 (2009).
264. Babayeva, N. D. *et al.* Structural basis of Ets1 cooperative binding to palindromic sequences on stromelysin-1 promoter DNA. *Cell Cycle* **9**, 3054–3062 (2010).
265. Babayeva, N. D., Baranovskaya, O. I. & Tahirov, T. H. Structural basis of Ets1 cooperative binding to widely separated sites on promoter DNA. *PLoS ONE* **7**, e33698 (2012).
266. Lamber, E. P. *et al.* Regulation of the transcription factor Ets-1 by DNA-mediated homo-dimerization. *EMBO J.* **27**, 2006–2017 (2008).

267. Leprivier, G., Baillat, D., Begue, A., Hartmann, B. & Aumercier, M. Ets-1 p51 and p42 isoforms differentially modulate Stromelysin-1 promoter according to induced DNA bend orientation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4341–4352 (2009).
268. Nakanishi, C. & Toi, M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 297–309 (2005).
269. Campbell, K. J., Witty, J. M., Rocha, S. & Perkins, N. D. Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor-kappaB transactivation. *Cancer Res.* **66**, 929–935 (2006).

Thomas THIBAULT

Stratégie du leurre moléculaire en thérapie génique : ciblage de facteurs de transcription par un minicercle d'ADN multisites et étude de l'interaction entre l'ADN platiné et NF-κB

En thérapie génique, la stratégie du leurre moléculaire consiste à utiliser un acide nucléique court contenant une séquence spécifiquement reconnue par un facteur de transcription cible, ce qui permet son piégeage intracellulaire et conduit à inhiber l'expression des gènes sous sa dépendance. L'efficacité thérapeutique de cette stratégie est notamment liée à la biostabilité de l'acide nucléique et à la possibilité de multicibler des facteurs de transcription qui coopèrent dans des dérégulations cellulaires à l'origine de nombreuses pathologies. Nous avons développé une technologie de production *in vitro* de minicercles d'ADN de moins de 250 paires de base pour interagir avec plusieurs protéines, fonctionnalisables chimiquement et résistants aux exonucléases. Un double ciblage du facteur de transcription NF-κB par un minicercle permet l'inhibition *in cellulo* d'un système rapporteur de la transcription NF-κB dépendante, en faveur d'une activité leurre moléculaire du minicercle.
Le cisplatine est une molécule anticancéreuse dont la cible pharmacologique est l'ADN. Dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, la baisse d'activité transcriptionnelle de NF-κB a été reliée à une augmentation de la sensibilité des cellules au cisplatine. Nous avons étudié *in cellulo* si le mécanisme d'inhibition de NF-κB par le cisplatine pouvait dépendre de la platination de son site consensus à l'aide d'une application originale de la stratégie leurre moléculaire. Nous montrons que les adduits du cisplatine contrairement à ceux du transplatine (isomère inactif) diminuent la reconnaissance de NF-κB pour son site consensus *in vitro* et *in cellulo*.
La stratégie leurre moléculaire de multiciblage avec un minicercle d'ADN sera développée au niveau cellulaire pour faire la preuve de concept de cette approche et démontrer son efficacité biologique.

Mots clés : leurre moléculaire, minicercle d'ADN, thérapie génique, multiciblage, facteur de transcription NF-κB, cisplatine.

Decoy strategy in gene therapy: targeting transcription factors by multisite DNA minicircle and study of the interaction between platinated DNA and NF-κB

In gene therapy, decoy strategy consists in using short nucleic acid containing a sequence specifically recognized by a transcription factor in order to trap it and in turn to inhibit the expression of genes under its control. The therapeutic efficacy of this strategy is related to the biostability of the nucleic acid and the possibility to target several transcription factors that cooperate to induce cell deregulations responsible in human diseases. We have developed a technology to product *in vitro* DNA minicircle less than 250 base pairs which can interact with several proteins, chemically functionalizable and resistant to exonucleases. A dual targeting of the transcription factor NF-κB by a minicircle allows inhibition *in cellulo* of a NF-κB-dependent transcription reporter system consistent with a decoy activity induced by the minicircle.
Cisplatin is an anticancer drug whose pharmacological target is DNA. In several cancer cell lines, the decrease of transcriptional activity of NF-κB has been linked to an increase in the sensitivity of cells to cisplatin. We studied *in cellulo* whether the mechanism of inhibition of NF-κB by cisplatin could depend on the platination of its consensus sequence using a novel application of the decoy strategy. We show that cisplatin adducts, unlike those of transplatin (inactive isomer), decreases recognition of NF-κB to its consensus sequence *in vitro* and *in cellulo*.
Decoy strategy with minicircle DNA will be developed to make the proof of concept of this approach at the cellular level and further to demonstrate its biological effectiveness.

Keywords: Decoy, DNA minicircle, gene therapy, transcription factor NF-κB, cisplatin.

Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 2